



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

LUIS FELIPE TRINCAS ASSAD SALLUM

IMUNOEXPRESSÃO DE MARCADORES PROTEICOS DE DIFERENCIAÇÃO E
PROLIFERAÇÃO CELULAR EM MULHERES COM CARCINOMA SEROSO DE
OVÁRIO DE BAIXO E ALTO GRAU

*IMMUNOEXPRESSION OF PROTEIN MARKERS OF CELL DIFFERENTIATION AND
PROLIFERATION IN WOMEN WITH LOW-GRADE AND HIGH-GRADE SEROUS
OVARIAN CARCINOMAS*

CAMPINAS

2017

LUIS FELIPE TRINCAS ASSAD SALLUM

IMUNOEXPRESSÃO DE MARCADORES PROTEICOS DE DIFERENCIAÇÃO E
PROLIFERAÇÃO CELULAR EM MULHERES COM CARCINOMA SEROSO DE
OVÁRIO DE BAIXO E ALTO GRAU

*IMMUNOEXPRESSION OF PROTEIN MARKERS OF CELL DIFFERENTIATION AND
PROLIFERATION IN WOMEN WITH LOW-GRADE AND HIGH-GRADE SEROUS
OVARIAN CARCINOMA*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde, na Área de Oncologia Ginecológica e Mamária.

Thesis presented to the Obstetrics and Gynecology Post Graduation Program of School of Medical Sciences from State University of Campinas for obtaining the Ph.D. degree in Health Sciences in Gynecologic Oncology and Breast Cancer Area.

ORIENTADORA: PROFA. DRA. SOPHIE FRANÇOISE MAURICETTE DERCHAIN

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DE DOUTORADO DEFENDIDA PELO
ALUNO LUIS FELIPE TRINCAS ASSAD SALLUM, E ORIENTADO PELA
PROFA. DRA. SOPHIE FRANÇOISE MAURICETTE DERCHAIN.

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2012/15059-8; CNPq, 306583/2014-3

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Sa34i Sallum, Luis Felipe Trincas Assad, 1976-
Imunoexpressão de marcadores proteicos de diferenciação e proliferação celular em mulheres com carcinoma seroso de ovário de baixo e alto grau / Luis Felipe Trincas Assad Sallum. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Sophie Françoise Mauricette Derchain.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Cistadenocarcinoma seroso. 2. Diagnóstico diferencial. 3. Platina. 4. Análise de sobrevida. 5. Prognóstico. I. Derchain, Sophie Françoise Mauricette, 1959-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Immunoexpresion of protein markers of cell differentiation and proliferation in women with low-grade and high-grade serous ovarian carcinoma

Palavras-chave em inglês:

Cystadenocarcinoma, Serous

Diagnosis, Differential

Platinum

Survival analysis

Prognosis

Área de concentração: Oncologia Ginecológica e Mamária

Titulação: Doutor em Ciências da Saúde

Banca examinadora:

Sophie Françoise Mauricette Derchain [Orientador]

Glauco Baiocchi Neto

Luiz Claudio Santos Thuler

Adriana Yoshida

Carmen Silvia Passos Lima

Data de defesa: 20-07-2017

Programa de Pós-Graduação: Tocoginecologia

BANCA EXAMINADORA DA QUALIFICAÇÃO DE DOUTORADO

LUIS FELIPE TRINCAS ASSAD SALLUM

ORIENTADORA: PROFA. DRA. SOPHIE FRANÇOISE MAURICETT DERCHAIN

MEMBROS:

- 1. PROFA. DRA. SOPHIE FRANÇOISE MAURICETTE DERCHAIN**
 - 2. PROF. DR. GLAUCO BAIOCCHI NETO**
 - 3. PROF. DR. LUIZ CLAUDIO SANTOS THULER**
 - 4. PROFA. DRA. ADRIANA YOSHIDA**
 - 5. PROFA. DRA. CARMEN SILVIA PASSOS LIMA**
-

Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

DATA DA DEFESA: 20/07/2017

DEDICATÓRIA

A minha esposa Ana Paula,

Aos meus filhos Guilherme e Helena.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa. Dra. Sophie Françoise Mauricette Derchain, pela amizade, pelos seus ensinamentos, apoio e competente orientação deste trabalho.

A Profa. Dra. Liliana Andrade, pela amizade, colaboração, empenho, e por todo o suporte nas questões de anatomia patológica para a concretização desta tese.

Aos membros da banca de qualificação, Profas. Dras. Carmen Silvia Passos Lima, Adriana Yoshida e Diama Bhadra Andrade Peixoto do Vale que muito contribuíram para a elaboração final desta tese.

A Amanda Canato Ferracini pela colaboração e apoio na elaboração desta tese.

Aos alunos Rodrigo de Andrade Natal e Angelo Borsarelli Carvalho Brito pelo apoio e auxílio na elaboração das análises estatísticas.

Ao pessoal dos laboratórios de Patologia Experimental (CAISM-Unicamp), do Departamento de Anatomia Patológica (HC-Unicamp) e do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer AC Camargo pela disponibilidade e ajuda na execução de parte experimental deste trabalho.

As secretárias da oncologia Debora e Regina, sempre dispostas a ajudar.

A toda equipe multidisciplinar do CAISM, em especial a de enfermagem do ambulatório de oncologia pélvica.

Ao pessoal do SAME do CAISM que, sempre solícito, viabilizou o levantamento dos dados clínicos.

Ao Claudinei da ASTEC.

A todas as mulheres que participaram deste estudo.

A minha mãe Maria del Pilar e meu pai Raul (*in memoriam*), exemplos de amor, que sempre me apoiaram, me incentivaram a estudar e a alcançar meus objetivos.

Ao meu irmão Raul, colega de profissão, que sempre esteve presente incentivando e apoiando minhas decisões, tanto pessoais como profissionais.

RESUMO

Introdução: Apesar da heterogeneidade dos carcinomas de ovário (COs), na maioria das vezes são tratados de forma similar. **Objetivo:** Comparar as expressões imuno-histoquímicas (IHQs) da WT1, p53, p16, BRCA1, Ki67 e β -catenina nos carcinomas serosos de ovário de baixo (CSOBGs) e de alto grau (CSOAGs), e sua relação com as características clinicopatológicas e prognóstico. **Métodos:** Neste estudo retrospectivo, foram incluídos 21 CSOBGs e 85 CSOAGs, diagnosticados e tratados no Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti (CAISM/Unicamp), entre 1994 a 2013, com seguimento até dezembro de 2016. A classificação morfológica foi realizada de acordo com os critérios preconizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS). A IHQ foi realizada em lâminas de blocos de *TMA* (*tissue microarray*). **Resultados:** CSOAGs estiveram significativamente associadas ao estágio avançado ($p < 0,001$), maiores níveis de CA125 ($p < 0,001$), maior proporção de doença residual pós-cirúrgica ($p < 0,01$), e maiores taxas de progressão ou recorrência ($p = 0,001$). A expressão da p53 foi difusa em 68,2%, completamente ausente em 30,6% e focal em 1,2% dos CSOAGs, em comparação com os CSOBGs, que apresentaram expressão difusa em 9,5%, ausência completa em 81,0% e focal em 9,5% ($p < 0,0001$). A p16 e a ki67 foram expressas em 58,5% e 55,9% dos CSOAGs, respectivamente, em comparação com 9,5% dos CSOBGs ($p < 0,001$). A expressão focal ou ausência completa da p53 associada à expressão negativa da p16 foi encontrada em 90,5% dos CSOBGs, em contraste aos 88,1% dos CSOAGs que apresentaram expressão difusa ou ausência completa da p53 associada a expressão positiva da p16 ($p < 0,001$). O índice imuno-histoquímico p53/p16 e a classificação morfológica foram concordantes ($k = 0,68$). As expressões da WT1 (71,4% vs 57,1%, $p = 0,32$), da BRCA1 (38,1% vs 21,7%, $p = 0,12$), e da β -catenina não diferiram entre os COs (80,9% vs 81,9%, $p = 1,00$). As características clinicopatológicas e sobrevida não diferiram de acordo com as expressões da BRCA1, Ki67 e β -catenina. As expressões da WT1, p53 e p16 foram analisadas juntamente nas análises de sobrevida. Na análise univariada, apenas o estágio e o grau histológico estiveram relacionados a uma pior sobrevida livre de progressão (SLP) e sobrevida global (SG). O índice imuno-histoquímico p53/p16 dos CSOAGs esteve relacionado a uma pior SLP. A expressão da WT1 não esteve associada a sobrevida. Na análise multivariada, o estágio e o grau histológico permaneceram como fator prognóstico independente para SLP, e apenas o estágio permaneceu associado a SG. Também analisamos a sobrevida relacionada as expressões da BRCA1, Ki67 e β -catenina. Na análise multivariada, o estágio e expressões da BRCA1, Ki67 e β -catenin não estiveram relacionados a uma pior sobrevida nos CSOBGs.

Nos CSOAGs, apenas o estágio permaneceu como fator prognóstico independente de sobrevida. **Conclusão:** O índice imuno-histoquímico p53/p16 foi um bom critério para diferenciação entre os CSOBGs e CSOAGs, mas a classificação morfológica mostrou uma melhor associação com a sobrevida. As expressões da WT1, BRCA1 e β -catenina não diferiram entre os COs, e como a Ki67 não estiveram relacionadas às características clínico-patológicas e sobrevida. A expressão da Ki67 foi maior nos CSOAGs. Somente o estágio permaneceu como fator prognóstico independente de sobrevida.

Palavras-chave: Cistadenocarcinoma seroso, diagnóstico diferencial, platina, análise de sobrevida, prognóstico.

ABSTRACT

Introduction: Despite the heterogeneity of histological subtypes of ovarian carcinoma, they are mostly treated in a similar way. **Objective:** The purpose of this study was to evaluate the diagnostic and prognostic value of the immunohistochemical expression of WT1, p53, p16, BRCA1, Ki67 and β -catenin in between in low- (LGSOCs) and high-grade serous ovarian carcinomas (HGSOCs). **Methods:** For this retrospective cohort study, 21 LGSOCs and 85 HGSOCs stages I-IV were included. All patients were diagnosed and treated at the Women's Hospital Dr. José Aristodemo Pinotti (CAISM) of Campinas State University (UNICAMP), Brazil, from 1994 to 2013 and followed-up until December 2016. The Research Ethics Committee approved the project. The morphological classification was assessed according to the World Health Organization (WHO) criteria. Immunohistochemistry (IHC) was performed in tissue microarray slides. **Results:** HGSOCs had a significantly higher proportion of advanced stage disease ($p<0.001$), higher CA125 levels ($p<0.001$), were more likely to have post-surgery residual disease ($p<0.01$), and had a higher rate of disease progression and recurrence ($p=0.001$) when compared with women harboring LGSOC. In relation to age, menopause or response to chemotherapy there were no significant differences. p53 expression was diffuse in 68.2% of cases, was completely absent in 30.6% (totalling 98.8% of cases) and was focal in 1.2% of HGSOCs, compared with LGSOCs, which demonstrated diffuse expression in 9.5%, complete absence in 81.0% and focal expression in 9.5% ($p<0.0001$). p16 and Ki67 were expressed in 58.5% and 55.9% of HGSOCs, respectively, compared with 9.5% of LGSOCs samples ($p<0.001$). Focal or complete absence of p53 expression with negative p16 expression was found in 90.5% of LGSOCs, which was in contrast to the 88.1% of HGSOCs with diffuse or complete absence of p53 expression with positive p16 expression (<0.001). The IHC p53/p16 index and the morphological classification were closely matched ($k=0.68$). The expression of WT1 (71.4% of LGSOCs vs 57.1% of HGSOCs, $p=0.32$), BRCA1 (38.1% of LGSOCs vs 21.7% of HGSOCs, $p=0.12$) and β -catenin did not differ between LGSOC and HGSOC (80.9% vs 81.9%, respectively, $p=1.00$). The clinicopathological features and survival did not differ according to the BRCA1, Ki67 and β -catenin expression in either group. WT1, p53 and p16 expression were analyzed alongside classical prognostic factors in survival analyses. Only FIGO stage and histological grade were significantly associated with progression-free survival (PFS) and overall survival (OS). High-grade pattern IHC p53/p16 index was associated only poorer PFS. WT1 was not associated with either PFS or OS. According to the multivariate analyses, FIGO stage and histological

grade remained independent prognostic factors for PFS, while FIGO stage was the only factor related to OS. We also analyzed survival as related to BRCA1, Ki67 and β -catenin expression, alongside classical prognostic factors. In the multivariate analysis FIGO stage, BRCA1, Ki67 and β -catenin were not associated with survival in women with LGSOC. In women with HGSOC, only FIGO stage was independently associated with poor PFS and OS. **Conclusions:** The IHC p53/p16 index was a good marker for the differentiation of LGSOC and HGSOC, but the morphologic classification showed a better association with survival. WT1, BRCA1 and β -catenin expression did not differ between LGSOC and HGSOC women. Ki67 expression was higher in HGSOC. WT1, BRCA1, Ki67 and β -catenin expression were neither related to clinicopathological features nor survival. Only FIGO stage remained the only independent prognostic factor for survival.

Keywords: Cystadenocarcinoma, serous, diagnosis, differential, platinum, survival analysis, prognosis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADN/DNA	- Ácido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
APC	- <i>Adenomatous polyposis coli</i>
ARN/RNA	- Ácido ribonucleico (<i>ribonucleic acid</i>)
BRAF	- <i>Serine/threonine-protein kinase B-Raf</i>
BRCA 1	- Gene do câncer de mama 1 (<i>breast cancer 1</i>)
BRCA2	- Gene do câncer de mama 2 (<i>breast cancer 2</i>)
CA	- <i>California</i>
CA125	- <i>Cancer antigen 125</i>
CAISM	- Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
CDC	- <i>Centres for Disease Control and Prevention</i>
CDKN2A	- Gene supressor tumoral p16
CDKs	- <i>Cyclin-dependent kinases</i>
CEP	- Comitê de Ética em Pesquisa
CO/OC	- Carcinoma de ovário (<i>ovarian carcinoma</i>)
CSOAG/HGSOC	- Carcinoma seroso de ovário de alto grau (<i>high-grade serous ovarian carcinoma</i>)
CSOBG/LGSOC	- Carcinoma seroso de ovário de baixo grau (<i>low-grade serous ovarian carcinoma</i>)
DMSO	- Dimetilsulfóxido
ERBB2	- <i>Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2</i>
et al.	- e colaboradores
EUA/USA	- Estados Unidos da América (<i>United States of America</i>)
FAPESP	- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FFPE	- <i>Formaline fixed paraffin embedded</i>
FIGO	- Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
FZD	- <i>Frizzled</i>
GCIG	- <i>Gynaecological cancer inter group</i>
GSK3-beta	- Glicogênio sintetase quinase-3 beta
H&E	- Hematoxilina e eosina
HNPCC	- <i>Hereditary non-polyposis colorectal cancer</i>
HR	- <i>Hazard ratio</i>

IC/CI	- Intervalo de confiança (<i>confidence interval</i>)
IHQ/IHC	- Imuno-histoquímica (<i>immunohistochemistry</i>)
IL	- <i>Illinois</i>
INCA	- Instituto Nacional do Câncer
KRAS	- <i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
mRNA	- Ácido ribonucleico mensageiro
n	- <i>Número de casos</i>
NC	- North Carolina
NJ	- New Jersey
OMS/WHO	- Organização Mundial de Saúde (<i>World Health Organization</i>)
p	- Nível de significância
PARP	- <i>Polyadp-ribose polymerase</i>
pRB	- Proteína do gene do retinoblastoma
SAS	- <i>Statistical analysis system</i>
SD	- <i>Standard deviation</i>
SET	- Semelhante ao endometrióide e células transicionais
SG/OS	- Sobrevida global (<i>overall survival</i>)
SLP/DFS	- Sobrevida livre de progressão (<i>disease-free survival</i>)
SOC	- <i>Serous ovarian carcinoma</i>
SPSS	- <i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
STIC	- <i>Serous tubal intraepithelial carcinomas</i>
TMA	- <i>Tissue microarray</i>
UNICAMP	- Universidade Estadual de Campinas
USPSTF	- <i>U.S. preventive services task force</i>
UV	- Radiação ultravioleta
vs	- <i>versus</i>
WT1	- <i>Gene do tumor de Wilms 1</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Justificativa.....	29
2. OBJETIVOS	30
2.1. Objetivo Geral	30
2.2. Objetivos Específicos	30
3. METODOLOGIA.....	31
3.1. Inclusão das mulheres	31
3.2. Construção do microarranjo de tecidos (tissue microarray ou TMA).....	33
3.3. Preparação do material para estudo imuno-histoquímico	34
3.4. Interpretação das reações imuno-histoquímicas.....	35
3.5. Análise Estatística	36
4. RESULTADOS.....	38
4.1. Artigo 1 - WT1, p53 and p16 expression in the diagnosis of low- and high-grade serous ovarian carcinomas and their relation to prognosis.	38
4.2. Artigo 2 - BRCA1, Ki67 and β -catenin immunoexpression is not related to differentiation, platinum response or prognosis in women with low- and high-grade serous ovarian carcinoma	56
5. DISCUSSÃO GERAL	79
6. CONCLUSÃO.....	88
7. REFERÊNCIAS	89
8. ANEXOS	103
Anexo 1 - Elsevier License Terms and Conditions	103
Anexo 2 - Parecer CEP	104
Anexo 3 - Ficha de coleta de dados	108
Anexo 4 - John Wilwy and Sons License Terms and Conditions	109

1. INTRODUÇÃO

O câncer de ovário ocorre em todas as fases ao longo da vida da mulher, variando o tipo histológico de acordo com a idade (Berek e cols., 2015). O câncer de ovário não é uma neoplasia ginecológica frequente, representando 4% dos diagnósticos de câncer em mulheres por ano, porém é a quinta causa de morte relacionada ao câncer ginecológico (Siegel e cols., 2011; Berek e cols., 2015). A incidência mundial do câncer de ovário é de 238,719 casos novos por ano, com uma prevalência de 22,6 casos por 100 mil mulheres em 5 anos (GLOBOCAN, 2012; Yamaguchi e cols., 2014). Estima-se em 2017 nos Estados Unidos, 22,440 casos novos de câncer de ovário diagnosticados e 14,080 mortes (American Cancer Society, 2017). No Brasil estimou-se 6,150 casos novos de câncer de ovário no ano de 2016, com um risco de 6 casos por 100 mil mulheres, e 2,383 mortes no ano de 2013 (INCA, 2016). No estado de São Paulo a incidência é de 7,03 casos por 100 mil mulheres e ocorrem principalmente após os 50 anos aumentando proporcionalmente com a idade, sendo mais frequente entre 60 e 64 anos (INCA, 2014; Berek e cols., 2015).

Não existe um rastreamento efetivo que reduza a mortalidade por câncer de ovário. Estudos utilizando o marcador sérico *cancer antigen 125* (CA125) combinado ou não ao exame ginecológico e ultrassonografia pélvica, não demonstraram benefícios e reprodutibilidade populacional. Por ser uma doença de baixa prevalência o valor preditivo positivo de um teste de rastreamento é baixo (Menon e cols., 2005; Buys e cols., 2011; Reade e cols., 2013; USPSTF, 2015; Sölétormos e cols., 2016).

A pesquisa UKCTOCS (*UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening*) foi o único trabalho que demonstrou alguma melhora de sobrevida no rastreamento em mulheres com câncer de ovário. Este estudo que selecionou 200 mil mulheres na pós-menopausa, entre 50 e 74 anos de idade, em 13 centros de tratamento da Inglaterra, da Irlanda do Norte e do País de Gales, propôs um método de rastreamento denominado *MMS* (*multimodal screening*). Este método é baseado no marcador sério CA125, o qual utiliza um valor de corte variável e estabelecido de acordo com a idade da paciente, associado ao exame de ultrassonografia transvaginal. Apesar dos resultados iniciais publicados em 2013 (Reade e cols., 2013) não demonstrarem nenhum benefício na redução de mortalidade como método de rastreamento, nos dados publicados em 2016 observou-se uma redução da mortalidade em cerca de 15% nas mulheres elegíveis (sem contabilizar mulheres com alto risco de desenvolver câncer de ovário) rastreadas pelo método *MMS* após 7 a 14 do início do

rastreamento. Mas como os próprios autores sugerem, é necessário um maior tempo de seguimento e melhores avaliações sobre o custo-eficácia deste método antes que possa ser utilizado como método de rastreamento populacional (Jacobs e cols., 2016).

Baseando-se na origem das diferentes linhagens celulares, os cânceres de ovário são classificados em três tipos: epiteliais (85% a 90%), estroma ovariano (5% a 10%) e células germinativas (10% a 15%). Há ainda os tumores metastáticos no ovário que compreendem cerca de 5% a 15% das neoplasias ovarianas, sendo mais frequentemente oriundos do trato gastrointestinal, mama e endométrio (Kurman e cols., 2014).

O grupo das neoplasias ovarianas malignas de origem epitelial (carcinomas) é heterogêneo e classicamente classificado em 5 tipos histopatológicos principais, que são fenotipicamente, molecular e etiologicamente distintos, sendo estes: seroso (de alto grau e de baixo grau), mucinoso, endometrióide, sero-mucinoso, e de células claras (Bell e cols., 2005; Canevari e cols., 2006; Kurman e cols., 2008; Diniz e cols., 2011; Sieh e cols., 2013; Kurman e cols., 2014). Quando não há diferenciação celular reconhecida, é chamado de carcinoma indiferenciado. Raramente, o carcinoma pode apresentar duas ou mais diferenciações e é chamado de tipo histológico misto. Entre os carcinomas de ovário (COs), o tipo seroso é o mais prevalente, e corresponde aproximadamente entre 80% a 85% dos casos (Scully e cols., 1998; Siegel e cols., 2011; Berek e cols., 2015).

As características e duração dos sintomas nos COs são variadas, e normalmente dependem do estágio em que a doença é diagnosticada, e o comportamento biológico entre os vários subtipos histológicos, pode ser evidenciado por esta característica. Os carcinomas serosos de ovário de baixo grau (CSOBGs) são comumente diagnosticados em estádios iniciais, enquanto os carcinomas serosos de ovário de alto grau (CSOAGs) são diagnosticados em estádios avançados, caracterizando uma disseminação transcelômica mais evidente e precoce (Bankhead e cols., 2005; Lataifeh e cols., 2005; Berek e cols., 2015).

Nos estádios iniciais, os sintomas podem não ser notados ou serem inespecíficos e de curta duração, tais como: dor leve ou desconforto abdominal, irregularidade menstrual, dispepsia ou outros sintomas digestivos leves. Conforme a doença progride, os sintomas pioram ou tornam-se mais evidentes. A dor ou o desconforto abdominal pioram devido à ascite, podendo estar associados a sintomas respiratórios pelo aumento da pressão intra-abdominal ou pela transudação de fluido nas cavidades pleurais. Quase nunca se observa sangramento uterino anormal (Bankhead e cols., 2005; Lataifeh e cols., 2005; Nagle e cols., 2011; Berek e cols., 2015). Aproximadamente 2/3 dos COs são diagnosticados em estádios avançados (estádios III e IV da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia - FIGO)

(Mutch e cols., 2014), para os quais a sobrevida média livre de doença não ultrapassa dezoito meses. A sobrevida em 5 anos para todos os estádios é de 45,6%, quando diagnosticada em estádios iniciais é de 92,1%, diminuindo para 28,3% nos casos avançados (Howlader e cols., 2016).

Entre os fatores de risco para CO, sabe-se que mulheres nuligestas tem o risco aumentado em relação à população em geral. Ao contrário, gestação em idade precoce, paridade (redução de 25% para o primeiro nascimento e 20% para os nascimentos subsequentes), amamentação (redução de 20% a cada ano), menopausa precoce e o uso de contraceptivos hormonais orais (mais de 10 anos de uso reduz o risco em 50%) estão associados com menor risco (Negri e cols., 1991; Berek e cols., 2015) e são considerados fatores de proteção. Recentemente a salpingooforectomia (mais de 90% de redução) e a ligadura tubária (salpingectomia) (20 % a 50% de redução) também são descritos como fatores de proteção (CDC, 2016).

São considerados fatores que aumentam o risco, idade acima dos 60 anos, infertilidade, endometriose, história familiar de câncer de mama, ovário ou colorretal, portadores de mutações no gene *breast cancer 1 (BRCA1)* ou *breast cancer 2 (BRCA2)* ou síndrome de Lynch II (CDC, 2016).

Enquanto cerca de 80% a 90% dos COs ocorrem de forma esporádica, em 10% a 20% das mulheres existem fatores hereditários predisponentes (componente genético ou familiar). Este risco depende do gene afetado e da mutação específica em cada caso (Permuth-Wey e cols., 2009; Pennington e cols., 2012). As principais síndromes hereditárias descritas são: a) síndrome do câncer de mama e ovário hereditário (devido a mutações dos genes supressores de *BRCA1/2* e, b) síndrome de Lynch II (câncer colorretal hereditário não associado à polipose intestinal - *hereditary non-polyposis colorectal cancer HNPCC*) (Hunn e cols., 2012; American Cancer Society, 2016). Enquanto o risco de câncer de ovário na população geral é de 1,3%, para estas mulheres com fator hereditário, as estimativas variam entre 10% a 60% sendo, nestes casos, o fator de risco mais importante à presença de um parente de primeiro grau com a doença (Piver e cols., 1996; Permuth-Wey e cols., 2006; Howlader e cols., 2016). As mulheres com mutações nos *BRCA 1/2* possuem um risco de até 50% de desenvolver câncer de ovário durante a vida, e na síndrome *HNPCC* este risco está entre 9% a 12% (Lancaste e cols., 2015).

Os genes *BRCA1/2* atuam como genes de supressão tumoral suprimindo indiretamente o crescimento neoplásico (ciclo celular), codificando proteínas que atuam no reparo e manutenção da integridade do genoma humano (ADN – ácido desoxirribonucleico)

(Garg e cols., 2013). A disfunção dos genes *BRCA1/2* frequentemente é observada nas mulheres com CSOAG, por mutações da linha germinativa, mutações somáticas e metilação do promotor do gene (Weissman e cols., 2012; Garg e cols., 2013). De acordo com os dados do *TCGA (Cancer Genome Atlas project)* até 50% das mulheres com CSOAG podem apresentar deficiências no reparo por recombinação homóloga como uma mutação nos genes *BRCA1/2* (Cancer Genome Atlas Research Network, 2011).

O *BRCA1* está localizado no braço longo do cromossomo 17 e o *BRCA2* foi mapeado no braço curto do cromossomo 13. Em mulheres com mutações nos genes *BRCA1/2* a incidência de câncer de ovário ocorre em idades mais precoces, principalmente em portadoras de mutações no *BRCA1*, com idade mediana ao diagnóstico em torno de 40 anos (Garg e cols., 2013). O gene supressor do *BRCA1* está associado a um risco de 55% a 85% para o câncer de mama, e de 20% a 50% para o câncer de ovário. A proporção de câncer de ovário na população em geral associado a mutações no *BRCA1* é de aproximadamente 5,9% para mulheres com 30 anos ou mais jovens, diminuindo progressivamente e chegando a 1,8% em mulheres na sétima década de vida. São consideradas características familiares sugestivas de mutações no gene *BRCA1*: dois ou mais casos de câncer de ovário na mesma família, câncer de mama e ovário na mesma mulher, um ou mais casos de câncer de mama na menacme com ou sem casos de câncer de ovário independente da idade ao diagnóstico, e câncer de mama masculino (Soslow e cols., 2012; Garg e cols., 2013). O gene supressor do *BRCA2* também está associado ao aumento do risco de câncer de mama e de ovário, com um risco semelhante ao *BRCA1* para o câncer de mama, e de 10% a 20% de câncer de ovário. Também está associado a um aumento de risco de câncer de mama masculina (5% a 6%), câncer do pâncreas e melanoma. As características familiares são semelhantes ao *BRCA1*, incluindo o câncer de pâncreas (Soslow e cols., 2012; Garg e cols., 2013).

Em estudos que avaliaram pacientes com mutações nos genes *BRCA1/2* e CSOAGs, observaram a associação com uma lesão tubária denominada carcinoma seroso intraepitelial tubário (*serous tubal intraepithelial carcinomas - STIC*) (Piek e cols., 2003; Kindelberger e cols., 2007; Kurman e cols., 2010; Nik e cols., 2014). Esta lesão *STIC* que geralmente está localizada nas fimbrias, se assemelha morfológicamente ao CSOAG, apresenta mutações na proteína p53 (*tumor protein p53*) e pode estar presente mesmo na ausência do câncer de ovário. Pode-se assim supor que, a maioria dos CSOAGs evoluem a partir desta lesão precursora das trompas (*STIC*) (Kurman e cols., 2016).

Sugeriu-se assim, uma nova teoria sobre a origem do carcinoma ovariano. Nesta

teoria, a doença poderia ter início em órgãos extra-ovarianos com acometimento do ovário secundariamente. O CSOAG surgiria através do deslocamento de células epiteliais das fímbrias tubárias para o epitélio da superfície ovariano exposto durante a ovulação, resultando na formação do cisto de inclusão cortical, que poderia ser um precursor da doença (Banet e cols., 2015). Outra forma seria a partir da sementeira de células neoplásicas das fímbrias diretamente na superfície ovariana (Kurman e cols., 2010; Kurman e cols., 2011).

A hipótese ou modelo teórico para a carcinogênese ovariana relacionada aos ciclos ovulatórios, a teoria da *ovulação incessante*, descrita por Fathalla em 1971, foi proposta uma vez que nenhuma lesão precursora no ovário havia sido identificada na época. Esta teoria baseava-se na observação de que as mulheres com números de ciclos ovulatórios mais frequentes apresentavam um risco maior de câncer de ovário, pois, cada ovulação criaria uma rotura ou “ferida” nas células do epitélio de superfície ovariano (Fathalla e cols., 1971). Estas células danificadas pelas ovulações ficariam aprisionadas no córtex ovariano e pelas tentativas de reparação (estresse replicativo) ocorreria um aumento de proliferação celular e assim, uma maior probabilidade de danos no ADN e de mutações definitivas (Ricciardell e cols., 2009; Koshiyama e cols., 2014). Em 2013, esta teoria foi revisada pelo mesmo autor, ressaltando que a origem tubárea do CO (*STIC*) também pode estar relacionada à da *ovulação incessante*, na medida em que, a ovulação causa o mesmo impacto no epitélio de superfície ovariano e nas células epiteliais tubáreas (Fathalla e cols., 1971; Fathalla e cols., 2013).

Como as evidências sugerem que a maioria dos carcinomas serosos alto grau primários do ovário, peritônio ou trompas compartilham a mesma patogênese, passam a ser considerados “carcinomas serosos pélvicos de alto grau” (Przybycin e cols., 2010). Em 2014, a FIGO (Mutch e cols., 2014) revisou o estadiamento do câncer de ovário e incluiu o câncer de trompa de falópio e peritoneal (porém sugerindo que sempre quando possível se defina o sítio primário) (Kurman e cols., 2008; Nik e cols., 2014; Berek e cols., 2015).

Ao observar que os COs compreendem um grupo heterogêneo e distinto em suas características clínico-patológicas e perfis moleculares, uma nova proposição de modelo dualista de patogênese foi proposta, dividindo-os em duas grandes categorias, tipo I e tipo II (Kurman e cols., 2008; Nik e cols., 2014). Este modelo também relaciona os tipos histológicos específicos com as suas relativas lesões precursoras (Kurman e cols., 2011).

Os tumores de ovário tipo I incluem os carcinomas serosos e endometrióides de baixo grau, mucinosos e de células claras. Os tumores tipo II, incluem os carcinomas serosos e endometrióides de alto grau, indiferenciados e tumores müllerianos mistos malignos (carcinossarcomas) (Kurman e cols., 2010; Schmeler e cols., 2010; Nik e cols., 2014).

Os carcinomas do tipo I correspondem a 25% dos carcinomas serosos de ovário, geralmente são volumosos, unilaterais e predominantemente císticos. Os carcinomas do tipo I são responsáveis apenas por 10% das mortes por câncer de ovário. O estadiamento cirúrgico quase sempre é possível por não apresentar doença extra-ovariana e, normalmente, na ausência de doença macroscópica, não se diagnostica doença oculta (microscópica) com o estadiamento cirúrgico (*upstaging*). São carcinomas de baixo grau, com exceção dos carcinomas de células claras que são sempre considerados como alto grau. Apresentam atipia nuclear leve a moderada e as figuras de mitose não são tão frequentes (até 12 mitoses em 10 campos de grande aumento). Apresentam comportamento indolente e quando diagnosticados em estádios iniciais apresentam um excelente prognóstico. Desenvolvem-se lentamente provavelmente a partir de lesões precursoras benignas ou *borderline*. São geneticamente estáveis, e estão associados a alterações moleculares tais como mutações em *BRAF* e *KRAS*. Geralmente não há mutação do gene *P53*, mas pode ocorrer a expressão imuno-histoquímica (IHQ) fraca ou focal do tipo selvagem da proteína p53 (*wild type*) (Kurman e cols., 2016).

Os tumores de ovário tipo II são diagnosticados em estádios avançados em mais de 75% dos casos. O CSOAG é o tipo histológico mais frequente neste grupo de neoplasias. São responsáveis por 90% das mortes por câncer de ovário. Apresentam atipia nuclear acentuada e mais de 12 figuras de mitose em 10 campos de grande aumento (Kurman e cols., 2016). São carcinomas de alto grau desenvolvem-se rapidamente e são altamente agressivos com disseminação precoce. As lesões ovarianas são menores quando comparadas aos do tipo I, e geralmente acometem ambos os ovários. Apesar de se apresentarem com lesões menores nos ovários, o volume de doença extra-ovariana tende a ser grande, envolvendo principalmente o omento e mesentério, e frequentemente apresentam ascite (Roh e cols., 2010; Kalloger e cols., 2011; Bodurka e cols., 2012; Soslow e cols., 2012; Patch e cols., 2015; Kurman e cols., 2016). Do ponto de vista molecular, são caracterizados por uma alta prevalência de aberrações estruturais e mutações do gene *P53* (em mais de 90% dos casos) e por um alto nível de instabilidade genética (Roh e cols., 2010; Kalloger e cols., 2011; Bodurka e cols., 2012; Soslow e cols., 2012; Patch e cols., 2015; Kurman e cols., 2016), com alta expressão da Ki67 (entre 50% a 70% dos casos), inativação da p16 (em 15% dos casos) e ausência de mutações dos *KRAS*, *BRAF* ou *erb-b2 receptor tyrosine kinase 2 (ERBB2)* (Salani e cols., 2008; Cho e cols., 2009; Koshiyama e cols., 2014). Originam-se principalmente da lesão precursora tubárea (*STIC*) e numa menor proporção do epitélio de superfície ovariano ou de cistos de inclusão do epitélio superficial (Kurman e cols., 2016).

As principais diferenças clinicopatológicas e moleculares entre os tumores de ovário tipo I e tipo II são mostrados no **quadro 1** (Kurman e cols., 2016).

Quadro 1. Características clinicopatológicas e moleculares dos carcinomas de ovário tipo I e tipo II

Características	Tipo I	Tipo II
Estágio	Frequentemente iniciais	Quase sempre avançados
Grau histológico	Baixo grau*	Alto grau
Atividade proliferativa	Geralmente baixa	Sempre alta
Ascite	Rara	Comum
Resposta à quimioterapia	Razoável	Boa (mas recorrência tardia)
Deteção precoce	Possível	Desafio
Progressão	Devagar e indolente	Rápida e agressiva
Resultado clínico geral	Bom	Ruim
Fatores de risco	Endometriose	Ciclos de ovulação ao longo da vida; mutação no gene <i>BRCA</i> **
Percursos	Tumor borderline (ou proliferativo atípico)	Na maioria das vezes <i>STIC</i> ***
Instabilidade cromossômica	Baixa	Alta
Mutações do gene <i>P53</i>	Infrequente	Quase sempre

Fonte: Robert J. Kurman and Ie-Ming Shih, 2016 (**anexo 1** - autorização nº. 4102120462643).

*Carcinoma de células claras não é graduado histologicamente, porém é considerado como alto grau; ***BRCA*: *breast cancer*; ****STIC*: *serous tubal intraepithelial carcinomas*.

Estudos morfológicos correlacionando os CSOAGs e câncer de mama que apresentam mutações dos genes *BRCA1/2*, têm fornecido evidências de que talvez o CSOAG pudesse ser subdividido em dois subconjuntos morfológicos: a) tipo usual e b) variante *SET* (semelhante ao endometrióide e de células transicionais). Os CSOAGs variante *SET* são mais sólidos, apresentam uma maior quantidade de linfócitos e um índice mitótico mais elevado, estando mais frequentemente associados com as mutações do *BRCA1*, e menos frequentemente associado ao *STIC*. Também se observou que, está associado a mulheres mais jovens e com melhor evolução clínica, talvez por apresentarem uma melhor resposta à quimioterapia (deficiência na reparação de recombinação homóloga) (Menon e cols., 2005; Soslow e cols., 2012; Howitt e cols., 2015; Kurman e cols., 2016).

O tratamento das mulheres com câncer de ovário depende do estágio clínico no momento do diagnóstico. Em mulheres com CO em estágio clinicamente inicial, a conduta baseia-se inicialmente no estadiamento cirúrgico. O estadiamento cirúrgico consiste em: inspeção (e a palpação) de todas as superfícies peritoneais e abdominais, coleta de lavado peritoneal, salpingo-ooforectomia bilateral, histerectomia total, omentectomia e dissecação de linfonodos pélvicos, para-aórticos e paracavais. A apendicectomia está indicada nos carcinomas mucinosos. Em casos selecionados de preservação da fertilidade, pode-se preservar o útero, o ovário e a trompa contralateral. Somente com o estadiamento cirúrgico sistemático, pode-se excluir ou minimizar o risco da presença de doença subclínica ou microscópica (*upstaging*). Após esta avaliação, indica-se quando necessário o tratamento adjuvante, dependendo do subtipo histológico e estágio cirúrgico (Trimbos e cols., 2017). Esta idéia de estadiamento cirúrgico em mulheres com câncer de ovário foi idealizada inicialmente nos anos de 1970, quando se começou a compreender um pouco da história natural da doença, e seus mecanismos de disseminação transcelômica e linfática (Piver e cols., 1978).

Nas mulheres com CO clinicamente avançado, o tratamento atual consiste na citorredução cirúrgica combinado à quimioterapia com paclitaxel e carboplatina por seis a oito ciclos (Alkema e cols., 2016). A citorredução cirurgia ideal seria o que se considera citorredução ótima, ou seja, ausência de doença residual macroscópica. A citorredução ótima, é um dos fatores prognósticos mais importantes relacionados a sobrevida quando associada à quimioterapia baseada em platina (Chang e cols., 2012; Chi e cols., 2012). Para esta citorredução ótima, alguns casos podem exigir uma cirurgia extensa com uma alta morbimortalidade intra e pós-operatória. Assim, em mulheres com doença clinicamente irresecável ou em casos selecionados de alto risco cirúrgico, a quimioterapia neoadjuvante pode ser uma opção por minimizar estes riscos intra e pós-operatório (Markauskas e cols., 2014; Gill e cols., 2017). Para avaliação de ressecabilidade em casos clinicamente duvidosos, a laparoscopia tem demonstrado ser uma ferramenta útil (Wright e cols., 2016).

Apesar dos avanços nos tratamentos do CO, ainda apresenta altas taxas de resistência a quimioterapia, recorrências e óbitos, e não se observou uma melhora significativa na sobrevida nas últimas décadas. Embora se observem altas taxas de resposta inicial à quimioterapia baseada em platina, entre 60% a 80% das mulheres recidivam, a maioria nos primeiros dois anos com doença resistente ou refratária, e este é mais um fator de mal prognóstico e pior sobrevida (Davis e cols., 2014; Hjortkjær e cols., 2017). Na recidiva, o principal fator prognóstico é o intervalo livre de doença após

o uso da platina, o que determina a sensibilidade ou resistência, sendo a resistência à platina o fator mais importante de pior prognóstico (Berns e cols., 2012).

De acordo com Patch e colaboradores (Patch e cols., 2015) a classificação da resposta à quimioterapia baseada em platina se divide em quatro categorias; a) refratários: a doença progride na vigência da quimioterapia inicial; b) resistente: tem progressão da doença nos primeiros seis meses após o término do tratamento inicial; c) sensível primário: pacientes sem evidência de progressão da doença nos seis meses após o término da quimioterapia ou pacientes com normalização do CA125, ou 50% de diminuição (desde que tivesse aumentado no início) por múltiplas linhas de quimioterapia baseada em platina; d) resistência adquirida: pacientes que não respondem mais a platina na doença recidivada, após terem respondido a platina em tratamento anterior. Mesmo entre os pacientes sensíveis à platina, a probabilidade de resposta de segunda linha baseado em platina é limitada a aproximadamente 60%, e eventualmente todas as mulheres podem se tornar resistentes à platina ao longo do tempo (Colombo e cols., 2014; Hjortkjær e cols., 2017). Até o momento não existem marcadores que identifiquem precocemente a resistência à platina ou que possam direcionar o tratamento (Sölétormos e cols., 2016; USPSTF, 2016; Hjortkjær e cols., 2017).

O marcador sérico CA125 é útil na investigação pré-operatória de massas pélvicas, na avaliação de resposta a quimioterapia e na detecção de recidiva da doença (Bast e cols., 2005). Como esteve relacionado ao prognóstico quando medido no momento do diagnóstico (Jacobs e cols., 2016), sugere-se então, que este marcador deva ser utilizado para avaliação de resposta ao tratamento, e parece ter uma correlação com a sobrevida quando medido trinta dias após o término do terceiro ciclo de quimioterapia na doença avançada ou recidivada (Bast e cols., 2005). Assim, mulheres que apresentavam o marcador sérico CA125 elevado antes do tratamento, e que se normaliza com a quimioterapia, quando apresenta uma elevação, este pode ser preditivo de doença ativa (Moore e cols., 2012; Xu e cols., 2012).

Em 2009 iniciamos nossos estudos com alguns marcadores proteicos IHQ e suas relações com o CO. Optamos pela IHQ e pelo *tissue microarray* (TMA) por ser uma técnica acessível aos patologistas, validada para o câncer de ovário e com boa acurácia inter-observador (Rosen e cols., 2004). Inicialmente avaliamos os padrões da expressão dos receptores de estrógeno (RE) e de progesterona (RP) em tumores *borderline* e COs (Sallum e cols., 2011; Ferreira e cols., 2012; de Toledo e cols., 2012; Sallum e cols., 2013; de Toledo e cols., 2013). Atualmente estamos estudando outros marcadores proteicos, que podem auxiliar no diagnóstico diferencial dos carcinomas serosos de ovário, e serem possíveis marcadores de sobrevida ou quimioresistência à platina.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) a classificação histológica dos carcinomas serosos de ovário se baseia apenas em critérios morfológicos. Os CSOBGs apresentam monotonia celular, com atipia nuclear leve a moderada e índice mitótico de até 12 mitoses em 10 campos de grande aumento, enquanto que, os CSOAGs mostram atipia nuclear acentuada e mais de 12 figuras de mitose em 10 campos de grande aumento. Muitas vezes esta diferenciação é difícil, não só entre os serosos de baixo e alto grau, mas também entre outros tipos de COs. Nestes casos, são necessárias outras ferramentas que auxiliem na caracterização diagnóstica. A IHQ seria uma técnica importante, por seu baixo custo e fácil reprodutibilidade, não apenas para auxiliar na caracterização diagnóstica, mas também como preditor do comportamento biológico e de resposta ao tratamento e sobrevida.

O gene do tumor de Wilms 1 (*WT1*) é um gene supressor tumoral localizado no cromossomo 11p13. Foi clonado em 1990, e pela inativação de ambos os alelos, foi inicialmente identificado como o gene responsável pelo desenvolvimento do tumor de Wilms em crianças (Pritchard-Jones e cols., 1990; Scharnhorst e cols., 2001; Cathro e cols., 2005). Ele parece ter um papel importante na transcrição do ARN (ácido ribonucleico). Apesar de ser inicialmente descrito como um gene supressor, paradoxalmente, encontra-se às vezes como um ativador da transcrição e às vezes como inibidor dependendo do contexto celular. Além disso, o gene *WT1* está supostamente envolvido no metabolismo de ácido ribonucleico mensageiro (*mRNA*) (Ladomery e cols., 2003; Netinatsunthorn e cols., 2006).

A expressão da proteína WT1 tem sido descrita em diferentes tipos de cânceres em adultos, e neste contexto agindo como um estimulador de crescimento do tumor, tais como o câncer colorretal (Koesters e cols., 2004), mama (Loeb e cols., 2001) e tumor desmóide (ou fibromatose) (Nik e cols., 2005). Nos tecidos normais a WT1 é expressa no rim, testículo, ovário (tanto nas células do estroma gonadal, da granulosa, como do epitélio de superfície), baço e nas células mesoteliais que revestem a cavidade peritoneal. A WT1 não é encontrada no epitélio normal da trompa de Falópio ou do endométrio (He e cols., 2008). A expressão IHQ da proteína WT1 pode ser utilizada em patologias ginecológicas para fins de diagnóstico e talvez como marcador de carcinoma seroso de ovário, diferenciando-os de outros subtipos ou tipos histológicos (Schorge e cols., 2000; Goldstein e cols., 2001; Netinatsunthorn e cols., 2006; Köbel e cols., 2008; Köbel e cols., 2014).

Alguns trabalhos avaliaram a expressão da WT1 e sua correlação com o prognóstico nos COs. Nestes estudos os dados foram conflitantes, provavelmente por utilizarem coortes compostas de diferentes subtipos histológicos de COs. Köbel e cols. (2008) e Taube e cols. (2016), demonstraram que a expressão da WT1 seria um fator prognóstico favorável nos

CSOAG. Netinatsunthorn e cols. (2006) e Liu e cols. (2014), ao contrário, demonstraram ser um fator prognóstico desfavorável, porém nestes estudos, não foi realizado uma análise separando os diferentes tipos histológicos. Høgdaal e cols. (2007) inicialmente encontraram uma correlação desfavorável para os COs, mas ao analisar os CSOAGs avançados separadamente, esta correlação não se manteve. Pelos conceitos atuais sobre diferentes vias de patogênese, os diferentes tipos histológicos de CO são considerados doenças distintas e assim, devem ser avaliadas criticamente os trabalhos que não fazem esta distinção (He e cols., 2008).

O gene *WT1* atua como um oncogene em muitos órgãos diferentes, e é de grande importância definir quando e como o gene *WT1* e proteínas agem, e avaliar uma possível associação ao prognóstico no câncer de ovário. Um melhor conhecimento sobre o *WT1* como fator prognóstico deverá ser útil no desenvolvimento e na avaliação de terapias-alvo e imunoterapias ou, no uso como biomarcador de CSOAG (Coosemans e cols., 2013^a; Coosemans e cols., 2013^b). Ensaios clínicos com uma vacina de *WT1* têm sido publicados para diferentes neoplasias (Keilholz e cols., 2009; Takahashi e cols., 2013; Kato e cols. 2014) e os primeiros ensaios experimentais para CO já foram conduzidos (Coosemans e cols., 2013^a; Coosemans e cols., 2013^b). Um estudo avaliando a efetividade imunológica, efeitos colaterais e o impacto na sobrevida desta vacina nas neoplasias malignas ginecológicas resistentes à terapia tradicional (câncer de ovário, do colo uterino e do endométrio) está em curso no Hospital Universitário Charité – Berlim, Alemanha (Taube e cols., 2016).

O gene *P53* é um gene supressor de tumor que está localizado no braço curto do cromossomo 17 que codifica a proteína nuclear de 53-KD (Lee e cols., 2013). Este é responsável pela manutenção da integridade do genoma pela indução do apoptose celular em caso de dano adquirido no ADN. Mutação em um alelo do gene *P53* pode resultar em alteração ou inativação desta função (Ferreira e cols., 2012). Mais de 30% das mutações ocorrem em locais CpG nos códons 157, 175, 245, 248 e 282 que estão localizados nos exons 5, 7 e 8 (Lee e cols., 2013). A perda da função do *P53* desempenha um papel central no desenvolvimento do câncer, sendo esta a alteração genética mais comum nos cânceres humanos (Lee e cols., 2013).

No CO, esta perda de função do gene *P53* ocorre principalmente nos estádios avançados (III e IV). Por isso, sugerem-se duas hipóteses: a) a mutação do *P53* é um evento precoce na carcinogênese ovariana, ou b) essa alteração confere um fenótipo mais agressivo responsável pelo crescimento rápido dos tumores (Canevari e cols., 2006). As mutações no gene *P53* podem ser sugeridas pelos critérios imuno-histoquímicos, e utilizado para diferenciar o carcinoma seroso de alto e baixo grau. Nos CSOAGs a expressão forte e difusa

ou a completa falta de expressão da p53 (*null type*) estão associadas à mutação do gene *P53*, enquanto que, a expressão fraca e focal constitui o chamado *wild type* sem relação com a mutação do gene (O'Neill e cols., 2007; Köbel e cols., 2014).

A p16 (p16^{INK4a}) é uma proteína supressora de tumor, que em seres humanos é codificada pelo gene *CDKN2A* localizado no cromossomo 9 (9p21.3). É o principal membro da família INK4 de inibidores das quinases dependentes de ciclina (*cyclin-dependent kinases - CDKs*). Este gene é frequentemente mutado ou deletado em uma ampla variedade de tumores, sendo conhecido por ser um importante gene supressor tumoral. A proteína do gene do retinoblastoma (pRB) controla a transição da progressão da fase G1 para fase S do ciclo celular, sendo esta atividade regulada pela fosforilação. No estado não fosforilado, liga-se ao fator de transcrição E2F (Romagosa e cols., 2011; Beirne e cols., 2016). A proteína p16 liga-se às CDKs, principalmente as CDK4 e CDK6 e mantém a proteína do gene pRB em seu estado não fosforilado. Esta se liga ao fator de transcrição E2F, formando o complexo E2F-RB, que impede a progressão do ciclo celular (Hara e cols., 1997; Serrano e cols., 1999). Quando as CDK4 e CDK6 se ligam à ciclina D1 e formam um complexo de proteína ativa que fosforila pRB, o fator de transcrição E2F, que é crítico para dar início à replicação do ADN, se dissocia do complexo, é liberado, e entra no núcleo para ativar a progressão do ciclo celular às fases G1/S. A expressão da p16 é controlada de acordo com os níveis de pRB, e uma função reduzida ou ausente de pRB resulta em aumento dos níveis de p16 (Hara e cols., 1996; Pei e cols., 2005; Romagosa e cols., 2011; Rayess e cols., 2012). A p16 mantém membros da família pRB num estado hipofosforilado, no entanto, é difícil explicar muitos aspectos da função da p16 e da sua regulação como um supressor tumoral sozinho. Além disso, as vias moleculares responsáveis pela função da p16 e pela sua expressão ainda não foram totalmente determinadas (Serrano e cols., 1999; Pei e cols., 2005; Romagosa e cols., 2011; Beirne e cols., 2016).

A expressão da proteína p16 foi analisada em alguns estudos e observou-se que, aproximadamente 60% dos CSOAGs apresentam sua expressão difusa. Assim, tanto a proteína p53 como a p16, podem ser utilizadas como marcadores imuno-histoquímicos no diagnóstico diferencial entre carcinoma seroso de alto grau de outros tipos histológicos de COs (Kurman e cols., 2014; Köbel e cols., 2014).

Köbel e cols. (2014) publicaram recentemente um estudo no qual utilizaram alguns marcadores imuno-histoquímicos na avaliação de 54 mulheres com carcinoma seroso de ovário. Neste estudo propõem um algoritmo utilizando critérios imuno-histoquímicos para diferenciar os subtipos histológicos entre os COs (serosos de baixo e alto grau,

endometrióides, mucinosos e células claras). De acordo com este algoritmo imuno-histoquímico, a diferenciação entre carcinomas serosos de baixo e alto grau baseia-se na expressão IHQ das proteínas WT1, p53 e p16. A expressão nuclear da WT1 seria o marcador que diferenciaria os carcinomas serosos dos outros COs, uma vez que os carcinomas endometrióides, de células claras e mucinosos não expressam este marcador (Schorge e cols., 2000; Goldstein e cols., 2001; Netinatsunthorn e cols., 2006; Köbel e cols., 2008; Köbel e cols., 2014). De acordo com este algoritmo, para caracterização de CSOAG é necessário apresentar expressão do WT1 associado à expressão difusa da p53, ou sua ausência completa associada à expressão difusa da p16. Por outro lado, os CSOBGs além da expressão do WT1, não expressam a p53 ou apresentam expressão focal tanto da p53 (*wild type* - padrão de tipo selvagem) como da p16.

A maioria dos COs que apresentam inativação do gene *BRCA1* são os CSOAGs. A determinação de expressão da proteína BRCA1 por IHQ, teoricamente detecta os tumores com perda da função do gene *BRCA1* (Umar e cols., 2004; Permuth-Wey e cols., 2009; Kwon e cols., 2011; Soslow e cols., 2012). Estes estariam teoricamente associados a uma melhor sensibilidade à platina e consequentemente melhor prognóstico, quando comparado aos demais CSOAGs por inibição da *polyADP-ribose polymerase (PARP)* (Umar e cols., 2004; Kwon e cols., 2011; Soslow e cols., 2012). A IHQ para BRCA1 poderia servir como um teste de rastreio para detecção desta disfunção (teste de mutação germinal) (Umar e cols., 2004; Garg e cols., 2013; Kwon e cols., 2011; Hjortkjær e cols., 2017).

O Ki67 é um anticorpo, que detecta o antígeno nuclear humano, que se expressa na proliferação celular, e é um marcador estabilizador do crescimento tumoral celular. Está presente durante todas as fases ativas do ciclo celular, mas ausente nas células em repouso (Scholzen e cols., 2000; Khouja e cols., 2007). A contagem mitótica é um método tradicional e prático para avaliar a atividade proliferativa, e a detecção por IHQ de células em proliferação é uma forma alternativa de determinar o potencial proliferativo de um tumor: a expressão do antígeno Ki67 tornou-se um marcador amplamente utilizado para este fim. Como dito, é expresso durante todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose) e o anticorpo monoclonal Ki67 (MIB-1) reage com o antígeno Ki67 nuclear (Cattoretti e cols., 1992; Linden e cols., 1999; Aune e cols., 2011). Sua expressão é mais elevada no CSOAG em comparação com o CSOBG, uma vez que o alto grau tem um maior índice mitótico (Lim e cols., 2013; Kurman e cols., 2016).

Os dados relativos à expressão da Ki67 são limitados, e seu valor preditivo e prognóstico no carcinoma seroso continua controverso. Alguns estudos sugerem que a

expressão da Ki67 está associada à pior sobrevida, uma vez que os tumores altamente proliferativos estão associados a um pior prognóstico, e à doença em estádios avançados (Petrowsky e cols., 2001; Pollack e cols., 2004; Kritpracha e cols., 2005; Viale e cols., 2008; Margulis e cols., 2009; Mishra e cols., 2010). Argumenta-se que alguns desses estudos foram limitados por um pequeno número de pacientes, e pouca informação sobre os tratamentos adjuvantes (Aune e cols., 2011). No entanto, outros estudos indicam que a expressão da Ki67 esteve associada a uma melhor sobrevida livre de progressão (SLP), uma vez que tumores altamente proliferativos parecem responder melhor à quimioterapia baseada em platina (Khouja e cols., 2007; Liu e cols., 2012; Feng e cols., 2016; Grabowski e cols., 2016). Feng e cols. (2016) em um estudo envolvendo 875 pacientes com carcinoma seroso de alto grau verificaram que os casos com índices de expressão da Ki67 em mais de 50% das células tumorais (independente da intensidade), tinham SLP significativamente mais longa do que aqueles com índices de Ki67 inferiores a 50%, uma melhor SG, e foi um preditor independente de sensibilidade à platina. Em outro estudo envolvendo 203 mulheres com CO estádios II a IV (FIGO), Bachmayr-Heyda e cols. (2013) relataram que o risco de morte foi três vezes maior em pacientes com CO com ausência da expressão da Ki67, quando comparado com as mulheres com expressão positiva (considerando positiva $\geq 5\%$ dos núcleos das células coradas) (Chen e cols., 2016).

Assim, como a ausência de expressão da Ki67 parece estar associada a uma pior sobrevida e maior resistência à platina, talvez estas mulheres pudessem ser identificadas no momento da decisão terapêutica. A avaliação da expressão IHQ da Ki67 tem um baixo custo e boa reprodutividade, podendo ser incorporado facilmente na prática clínica (Aune e cols., 2011; Chen et al, 2016^a; Feng e cols., 2016).

A β -catenina constitui um dos componentes da unidade E-caderina de proteínas, e é essencial para a diferenciação e manutenção da arquitetura normal dos tecidos, apresentando um importante papel na transdução de sinais, em especial na via Wnt de transdução. O gene da β -catenina (*CTNNB1*) está localizado no cromossomo 3p22, uma região frequentemente alterada em uma variedade de tumores. As mutações na β -catenina levam à estabilização da E-caderina, que resiste à degradação fisiológica e passa a ser encontrada nos carcinomas (Davies e cols., 1998; Chou e cols., 2003; Ju e cols., 2003; Faleiro-Rodrigues e cols., 2004; Bhagat e cols., 2013).

A via Wnt é uma via de sinalização bem conhecida e estudada, com implicações importantes no ciclo celular. A proteína do gene *adenomatous polyposis coli* (*APC*) forma um complexo com Axina1, glicogênio sintetase quinase-3 beta (GSK3-beta) e β -catenina.

Em um estado inativo, o complexo diminui os níveis de β -catenina através de sua fosforilação, levando à sua degradação nos proteossomos. Porém, a ligação de Wnt ao seu receptor *Frizzled* (Fzd) inibe o complexo, aumentando os níveis de β -catenina no citoplasma sendo ela translocada para o núcleo, onde pode levar à ativação da transcrição de diversos genes (Fujimoto e cols., 1997; Davies e cols., 1998; Chou e cols., 2003; Ju e cols., 2003; Faleiro-Rodrigues e cols., 2004; Bhagat e cols., 2013).

Alguns estudos sugerem que a expressão da β -catenina está envolvida na carcinogênese, progressão, metastização e consequentemente pior sobrevida no CO. Está predominantemente localizada na membrana e citoplasma das células e raramente do núcleo (Wang e cols., 2013).

Wang e cols. (2013) descrevem que a expressão da β -catenina esteve associada ao estágio avançado no diagnóstico (FIGO) e a uma pior SG, mas não ao grau histológico (entre carcinomas serosos de alto e baixo grau). Não foi relatado nenhum caso de expressão da β -catenina apenas na membrana e/ou núcleo. Lee e cols. (2003) descreveram que a expressão da β -catenina no citoplasma ou na membrana não esteve relacionada ao grau histológico (carcinomas serosos de alto ou baixo grau), mas quando expressa apenas no núcleo, esteve significativamente relacionada aos CSOAGs (23% dos carcinomas de alto grau e 2,1% nos carcinomas de baixo grau) e consequentemente pior sobrevida. Neste estudo a SG não esteve significativamente relacionada à expressão nuclear de β -catenina entre os CSOAGs.

Alguns trabalhos referem que a ativação da via Wnt está associada a uma pior sobrevida em pacientes com CSOAGs, devido a uma maior resistência à quimioterapia baseada em platina (Su e cols., 2010; Rosanò e cols., 2014), porém, os mecanismos moleculares pelos quais a sinalização da via Wnt conduz à quimiorresistência são pouco compreendidos (Nagaraj e cols., 2015).

1.1. Justificativa

Apesar da heterogeneidade dos tipos histológicos dos COs, na maioria das vezes são tratados de forma similar. Isso fica evidente ao observarmos que, apesar dos avanços no tratamento cirúrgico e quimioterápico, a taxa de sobrevida para estas mulheres não apresentou melhora significativa nos últimos 50 anos (Nik e cols., 2014). O reconhecimento de que não se trata de uma doença única, mas composta por diferentes características e comportamentos clinico-patológicos e perfis moleculares, resultou em uma mudança no paradigma com implicações importantes para investigação, tratamentos e seguimento das mulheres com CO. Justifica-se o estudo de marcadores de diferenciação, proliferação celular, e de resistência à quimioterapia baseada em platina por IHQ (Sallum e cols., 2013), em carcinomas serosos de ovário de baixo e alto grau, assim como sua utilidade na caracterização e classificação histológica, associados ou não a classificação morfológica preconizada atualmente pela OMS (Kurman e cols., 2014). A avaliação da imunexpressão destes marcadores, também poderia auxiliar na identificação e num melhor entendimento dos processos que podem estar associados ao desenvolvimento de quimiorresistência associada à platina e sobrevida.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Comparar a imunexpressão de marcadores de diferenciação, proliferação celular, resistência à quimioterapia e prognóstico em mulheres com carcinoma seroso de ovário de baixo e alto grau e sua relação com resposta à platina e sobrevida.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Comparar a imunexpressão da WT1, p53 e p16 isoladamente e na forma de algoritmo em mulheres com carcinoma seroso de ovário de baixo e alto grau, e a relação destas imunexpressões no diagnóstico morfológico e sobrevida.

2.2.2. Comparar a imunexpressão da BRCA1, Ki67 e β -catenina em mulheres com carcinoma seroso de ovário de baixo e alto grau e sua relação com resposta à platina e sobrevida.

3. METODOLOGIA

Esta tese consiste em dois estudos inter-relacionados, realizados no Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). O método geral para os dois estudos é apresentado a seguir, enquanto os detalhes de cada um estão especificados nas respectivas publicações.

3.1. Inclusão das mulheres

É um estudo de coorte com coleta retrospectiva, para o qual foram selecionadas as mulheres submetidas à cirurgia por CO no Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - Centro de Atenção Integral a Saúde da Mulher (CAISM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas - São Paulo. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) (CEP 1086/2009) e pelos adendos cujos pareceres foram homologados na II reunião ordinária do CEP de março de 2017 (**anexo 2**).

Foram incluídas as mulheres com diagnóstico histológico de carcinoma seroso de ovário operadas no período entre janeiro de 1994 a dezembro de 2013, e o seguimento foi avaliado até dezembro de 2016. Foram selecionados no estudo os casos em que os blocos de parafina correspondentes às lâminas histológicas estavam disponíveis e cujos prontuários estavam completos para obtenção dos dados clínicos. Todas as análises histológicas foram realizadas em material coletado durante o tratamento cirúrgico inicial, ou antes, da quimioterapia. Foram identificadas 138 mulheres com diagnóstico histológico confirmado de carcinoma seroso de ovário.

As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e foram revisadas pela patologista especialista em ginecologia Profa. Dra. Liliana Andrade e pelo aluno Luis Felipe Sallum, que classificaram as lesões em carcinomas serosos de baixo e alto grau segundo os critérios morfológicos preconizados pela OMS (Kurman e cols., 2014), e depois reclassificados em tipo I e II de acordo com a classificação de Kurman e cols. (2008). Considerou-se CSOBGs os tumores que apresentavam monotonia celular, com atipia nuclear leve a moderada e índice mitótico de até 12 mitoses em 10 campos de grande aumento; por outro lado, CSOAGs mostram atipia nuclear acentuada e mais de 12 figuras de mitose em 10 campos de grande aumento. As lâminas e blocos foram levantados junto ao arquivo do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp. Foram incluídos exclusivamente os casos cuja avaliação histológica permitisse a classificação precisa do tipo histológico. Foram

excluídos casos com segundo tumor primário (2 mulheres), sem bloco de parafina disponível (22 mulheres), outro tipo histológico de CO (2 pacientes) e prontuários não disponíveis (6 mulheres). Obteve-se então 21 mulheres com CSOBGs grau e 85 mulheres com CSOAGs.

Os dados clínicos foram obtidos dos prontuários médicos e anotados em uma ficha de coleta de dados (anexo 3).

A idade da paciente foi considerada como o número de anos completos entre a data de nascimento e o momento da cirurgia segundo informação do prontuário médico. O estado menopausal foi obtido de dados da história clínica segundo informações do prontuário médico na data da primeira consulta. Consideram-se mulheres na pós-menopausa as com idade de 50 anos ou mais nas pacientes previamente hysterectomizadas ou intervalo maior que 365 dias da última menstruação em pacientes que apresentaram ao menos uma menstruação durante sua vida.

O estágio foi classificado de acordo com a FIGO (Mutch e cols., 2014) através do descritivo da cirurgia e do resultado anatomopatológico fornecido pelo patologista após o exame das peças cirúrgicas. O estadiamento foi atualizado e revisado na coleta dos dados do prontuário.

O nível sérico de CA 125 foi obtido pelo teste CA125 II através da técnica de eletroquimiluminescência em analisador automático Cobas e411 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) com valores expressos em unidades por mililitro (U/ml).

A cirurgia realizada foi classificada em cirurgia de estadiamento para mulheres com doença restrita ao ovário e citorrredutora em mulheres com doença avançada ou localmente avançada. A citorredução foi considerada ótima na ausência de doença residual macroscópica nas mulheres com doença avançada.

A quimioterapia foi realizada de acordo com protocolo do serviço, incluindo esquemas com carboplatina associada à ciclofosfamida ou taxol. Foi avaliado o número de ciclos de quimioterapia, o intervalo entre a cirurgia e o primeiro ciclo e o intervalo médio entre cada ciclo em semanas e o último ciclo. Em nossa amostra 78 mulheres com CSOAGs fizeram quimioterapia, sendo que 71 delas fizeram mais do que 6 ciclos. Entre as mulheres com CSOBGs apenas 6 mulheres não fizeram quimioterapia.

Para resposta à platina, o tempo de resposta foi estimado em meses a partir do final do tratamento primário de quimioterapia baseada em platina até a data da progressão. A resposta em relação à quimioterapia foi definida em; a) refratários: pacientes que tiveram evidências de progressão da doença durante tratamento primário ou em até 1 mês após o final deste tratamento, evidenciado por nível sérico persistente e elevado do CA125 ou por progressão

clínica; b) primariamente resistentes: pacientes que tiveram evidências de progressão da doença em até aproximadamente 6 meses do final do tratamento primário; c) primariamente sensíveis: pacientes sem evidências de progressão da doença após 6 meses do final tratamento primário ou que apresentaram níveis séricos de CA125 normais ou redução de 50% em relação aos níveis pré-tratamento (desde que tivessem níveis aumentado no início) por múltiplas linhas de tratamento baseadas em platina; d) resistência adquirida: mulheres que não responderam mais à platina na doença recidivada, embora tenham previamente apresentado sensibilidade a esta linha de quimioterapia em tratamento anterior. Sensibilidade inicial à platina é inferida às mulheres que apresentaram doença residual macroscópica após citorredução cirúrgica, e não tiveram progressão em até 6 meses após o término do tratamento quimioterápico primário, e/ou, que tiveram uma resposta completa ou maior que 50% em terapias de segunda ou terceira linha antes de desenvolverem resistência (Patch e cols., 2015;). A progressão/recidiva foi avaliada através de descrição do exame clínico no prontuário, exames de imagem ou níveis séricos do CA125.

SLP foi considerada como o tempo, em meses, entre o diagnóstico histológico e a progressão da doença, recidiva ou óbito pela doença baseado nos critérios da *Gynaecological Cancer Inter Group (GCIG)*, sendo esta identificada por exame clínico, exames de imagem ou pelos níveis séricos de CA125. SG foi considerada como o tempo, em meses, entre o diagnóstico histológico e a data da última consulta ou óbito, independente do motivo (Rustin e cols., 2011).

3.2. Construção do microarranjo de tecidos (tissue microarray ou TMA)

As lâminas histológicas originais do tumor, coradas rotineiramente em H&E, foram revisadas pela patologista especialista em ginecologia Profa. Dra. Liliana Andrade, e duas áreas representativas de cada tumor foram selecionadas, com marcação sobre a lâmina com tinta permanente. Após posicionamento das lâminas marcadas sobre os respectivos blocos de parafina, foi realizada a perfuração das duas áreas selecionadas com a agulha do aparelho de *TMA* (Beecher Instruments Microarray Technology, Silver Spring, CA, USA), com diâmetro de 1mm ou 6mm. Uma planilha para registro dos números dos blocos de parafina foi construída para avaliação e orientação da leitura das reações. As amostras retiradas dos blocos, ou cilindros de tecidos, foram ordenadas sobre o bloco receptor do aparelho de *TMA* com distância de 0,3mm entre si. Após, foram realizados cortes histológicos dos blocos de *TMA* em lâminas silanizadas (Starfrost®), recobertas com adesivo e submetidas à fixação por radiação ultravioleta (UV) (Instrumedics Inc®, Hackensack, NJ, EUA). Posteriormente, as lâminas

foram submetidas a banho de parafina e armazenadas em freezer a - 20°C, até o momento do uso para reação IHQ (Rosen e cols., 2004). Os blocos de *TMA* referentes às pacientes até o ano 2009 foram realizados no laboratório do Hospital A.C. Camargo Câncer Center – São Paulo, decorrente do trabalho cooperativo entre as instituições, os demais foram realizados no laboratório do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.

3.3. Preparação do material para estudo imuno-histoquímico

A preparação do material para estudo imuno-histoquímico de todos os casos foi realizada no laboratório do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.

As secções de cada bloco do *TMA* com 4µm de espessura, foram desparafinizadas em banho de xilol a 110°C e a seguir submetidas a dois banhos subsequentes em xilol à temperatura ambiente. Para as reações IHQs, os cortes do *TMA* nas lâminas sinalizadas foram hidratadas em álcool etílico em concentrações decrescentes (100%, 80%, 50%), e lavadas com água destilada corrente. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com três banhos, cada um com duração de 3 minutos, em água oxigenada a 10 volumes, seguida de lavagem em água corrente e destilada. Para recuperação antigênica utilizou-se a panela a vapor Pascal Dako, com o objetivo de “desmascarar” os antígenos. As lâminas foram imersas em tampão citrato de sódio pH 6,0 (10mM) à 95°C durante 30 minutos. A seguir, resfriadas em temperatura ambiente durante 20 minutos e lavadas em água corrente e destilada. Após esta etapa, os cortes histológicos foram incubados em câmara úmida com anticorpo primário específico, nas diluições preconizadas pelo fabricante (quadro 2), a 4°C, *overnight*. Após a incubação, as lâminas foram três vezes lavadas em tampão fosfato (PBS: solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 a 7,6), sob agitação e secadas.

Como sistema de detecção da reação foi usado ADVANCE™ HRP Detection System (DAKO, código K4067), onde as lâminas foram incubadas a 37°C durante 1 hora e a seguir, submetidas a três lavagens em solução tampão, sob agitação. Após a incubação, a revelação foi feita com substrato cromogênico DAB (3-diaminobenzidine, SIGMA, código D5637) na proporção de 0,06g para 100 ml em PBS, 500µl de água oxigenada 3% e 1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) à 37°C durante 5 minutos. Finalmente, as lâminas foram lavadas em água corrente e contra-coradas com hematoxilina de Harris durante 30 a 60 segundos. Os cortes foram desidratados em banhos de álcool etílico em concentrações crescentes e diafanizados em

três banhos de xilol para, a seguir, serem montadas em lamínula e resina (Entellan). Controles internos e externos positivos e negativos foram utilizados para validar as reações IHQs.

No quadro 2, estão os respectivos clones e diluições para imuno-histoquímica.

Quadro 2. Especificações dos anticorpos e diluições

Anticorpo	Clone	Produtor	Solução Tampão	Diluição
P53	DO-7	DAKO	Tris-Edta	1:500
P16	E6H4	mtm Laboratories AG	Tris buffer	Pronto para uso
Kit CINtec®				
WT1	6F-H2	DAKO	Tris-Edta	1:100
BRCA1	MS-110	MERCK MILLIPORE	Tris-Edta	1:100
Ki67	MIB-1	DAKO	Tris-Edta	1:500
β-catenina	β-catenin 1	DAKO	Tris-Edta	1:100

3.4. Interpretação das reações imuno-histoquímicas

A leitura das reações IHQs foi realizada pela patologista especialista em ginecologia Profa. Dra. Liliana Andrade e pelo aluno Luis Felipe Sallum, de acordo com o percentual e/ou intensidade das células coradas. Para cada marcador, foi utilizado um padrão de leitura, conforme os dados da literatura. Em casos de divergências entre a leitura das amostras de *TMA* no mesmo tumor, foi considerada a expressão mais forte.

A expressão da proteína WT1 é nuclear e foi assim considerada independente da intensidade: positivo se $\geq 1\%$ dos núcleos corados, e negativa se núcleos não corados ou corados em $< 1\%$ (Lee e cols., 2016).

A proteína p53 também tem expressão nuclear, e no CSOAG quando há mutação do gene *P53*, a p53 pode completamente ausente ou superexpressa dependendo do tipo de mutação. Para a leitura da expressão da p53, dividimos os casos em 3 grupos independente da intensidade, sendo: completa ausência, positivo focal se $\geq 1\%$ e $< 70\%$ dos núcleos corados e positivo difuso se $\geq 70\%$ dos núcleos corados (Kalloger e cols., 2011; Köbel e cols., 2014).

A reação da proteína p16 é expressa no núcleo e citoplasma, e foi assim considerada independente da intensidade: a expressão foi considerada negativa quando nenhuma célula foi corada ou se <90% das células coradas; e positiva quando corado em $\geq 90\%$ das células (Köbel e cols., 2014; Beirne e cols., 2016).

Também realizamos uma classificação IHQ proposta por Köbel et al. (Köbel et cols., 2014). Nesta classificação, que denominamos algoritmo imuno-histoquímico p53/p16, o padrão para o CSOBG foi definido como a expressão da p53 em $\geq 1\%$ e <70% dos núcleos e/ou a ausência completa da p53 associada a expressão da p16 em <90% das células; e o padrão para CSOAG foi definido como a expressão da p53 em $\geq 70\%$ dos núcleos (independente da p16) ou a ausência completa da p53 (*null type*) associada à expressão da p16 em $\geq 90\%$ das células. Esta caracterização IHQ foi utilizada para classificação entre os carcinoma seroso de ovário de baixo e alto grau, independente da classificação morfológica preconizada pela OMS.

A expressão da BRCA1 e da Ki67 é nuclear, e foi assim considerada: ausente ou baixa expressão (negativo) se não foi observada coloração nuclear ou se houve expressão em até 10% dos núcleos; alta expressão (positivo) se mais de 10% dos núcleos estavam corados (Köbel e cols., 2008; Carser e cols., 2011).

A avaliação da expressão da proteína β -catenina é mais complexa e implica na expressão nos diferentes compartimentos celulares: na membrana celular, no citoplasma e no núcleo. Foi considerada a coloração da membrana, do citoplasma e do núcleo separadamente e depois agrupadas em: apenas membrana, apenas citoplasma, citoplasma e membrana, e apenas núcleo. A leitura da expressão da β -catenina foi considerada positiva quando havia coloração do núcleo, do citoplasma ou do citoplasma e da membrana, independente da porcentagem de células ou intensidade; e negativo, quando havia apenas a coloração da membrana ou sem nenhuma reação (Wang e cols., 2013).

3.5. Análise Estatística

O significado estatístico das diferenças entre grupos foi calculado pelo teste da probabilidade exata de Fisher ou qui-quadrado (χ^2), enquanto para as variáveis contínuas foi usado Mann-Withney (dois grupos) ou Kruskal-Wallis (mais de dois grupos). A regressão logística múltipla foi feita para obter a razão das chances (ORs), ajustadas por eventuais discrepâncias específicas para cada variável categórica, considerando um intervalo de confiança (IC) de 95%. O Kappa foi calculado para avaliar a correlação entre o índice imuno-histoquímico p53/p16 com a classificação morfológica. A metodologia de Kaplan Meier foi

aplicada no cálculo da SLP e SG. O tempo da SLP contemplou o intervalo de dias entre a data do diagnóstico até a ocorrência do evento ou data da última consulta, sendo os eventos: progressão, recidiva ou óbito. A SG foi calculada entre a data do diagnóstico até data do óbito ou da última consulta, sendo o único evento óbito, enquanto para o cotejamento das curvas aplicou-se o teste log-rank (Kaplan e cols., 1958). Para obtenção de variáveis que influenciaram nas sobrevidas dos pacientes foi aplicada a regressão de Cox, com o método backward Wald Wald (Cox e cols., 1984). O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5% ($p < 0,05$). As análises foram realizadas com a utilização dos programas estatísticos *Statistical Package for the Social Sciences* versão 15,0 (SPSS Incorporation, Chicago, IL, USA) e *Statistical Analysis System* versão 9,2 (SAS Institute Incorporation, Cary, NC, USA) e *R Environment for Statistical Computing Software*.

4. RESULTADOS

4.1. Artigo 1 - WT1, p53 and p16 expression in the diagnosis of low- and high-grade serous ovarian carcinomas and their relation to prognosis.

Histopathology

[Home](#)
[Author](#)

Corresponding Author Dashboard / [Submission Confirmation](#)

Submission Confirmation [Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to

Histopathology

Manuscript ID

HISTOP-08-17-0555

Title

WT1, p53 and p16 expression in the diagnosis of low- and high-grade serous ovarian carcinomas and their relation to prognosis

Authors


Sallum, Luis Felipe
 Andrade, Liliana
 Ramalho, Susana
 Ferracini, Amanda
 de Andrade Natal, Rodrigo
 Brito, Angelo
 Sarian, Luis
 Derchain, Sophie

Date Submitted

29-Aug-2017

Author Dashboard >

SCHOLARONE™


 THOMSON REUTERS®

WT1, p53 and p16 expression in the diagnosis of low- and high-grade serous ovarian carcinomas and their relation to prognosis

Authors:

Luis Felipe Sallum, MD, PhD^a; Liliana Andrade, MD, PhD^b; Susana Ramalho, MD, MSc^a; Amanda Canato Ferracini, Pharmaceutic^c; Rodrigo de Andrade Natal, Post Grad^d; Angelo Borsarelli Carvalho Brito, MD^e; Luis Otávio Sarian, MD, PhD^a; Sophie Derchain, MD, PhD^a†

^a Department of Obstetrics and Gynecology, State University of Campinas, Campinas, Faculty of Medical Sciences, Campinas, São Paulo, Brazil.

^b Department of Pathology, University of Campinas, Campinas, Faculty of Medical Sciences, Campinas, São Paulo, Brazil.

^c Program in Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, Faculty of Medical Sciences, Campinas, São Paulo, Brazil.

^d Laboratory of Investigative and Molecular Pathology, State University of Campinas, Campinas, Faculty of Medical Sciences, Campinas, São Paulo, Brazil.

^e Laboratory of Cancer Genetics, State University of Campinas, Campinas, Faculty of Medical Sciences, Campinas, São Paulo, Brazil.

† Correspondence to: Sophie Derchain. Department of Obstetrics and Gynecology – Faculty of Medical Sciences – State University of Campinas. Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Zip code: 13083-970 – Campinas, São Paulo, Brazil. E-mail: derchain@fcm.unicamp.br. Phone +55 19 35219305

ABSTRACT

Objective: To evaluate the diagnostic and prognostic value of the immunohistochemical expression of WT1, p53 and p16 in low- (LGSOCs) and high-grade serous ovarian carcinomas (HGSOCs). **Methods:** 21 LGSOC and 85 HGSOC stage I-IV cases were included. The morphological classification was assessed according to the World Health Organization (WHO) criteria. Immunohistochemistry (IHC) was performed in tissue microarray slides. IHC p53/p16 index was compared with the morphological classification. **Results:** HGSOC had a significantly higher proportion of advanced stage disease, higher CA125 levels, higher proportion of post-surgery residual disease and higher recurrence or disease progression. WT1 was expressed in 71.4% of LGSOCs and in 57.1% of HGSOCs ($p=0.32$). Focal and/or complete absence of p53 expression with negative p16 expression was found in 90.5% of LGSOCs, in contrast to the 88.1% of HGSOCs with diffuse or complete absence of p53 expression with positive p16 expression (<0.001). The IHC p53/p16 index and the morphological classification were closely matched ($k=0.68$). In the univariate analysis, FIGO stage and histological grade were significantly associated with progression-free survival (PFS) and overall survival (OS). The IHC p53/p16 index was associated only with PFS. WT1 was not associated with PFS or OS. According to the multivariate analysis, FIGO stage and histological grade remained independent prognostic factors for PFS, while FIGO stage remained associated to OS. **Conclusion:** The IHC p53/p16 index was a good marker for the differentiation of LGSOC and HGSOC, but the morphologic classification showed a better association with survival. FIGO stage remained the only independent prognostic factor for survival.

Key words: Cystadenocarcinoma, serous, diagnosis, differential, platinum, survival analysis, prognosis.

Introduction

High-grade serous ovarian carcinomas (HGSOCs) comprise the majority of serous ovarian carcinomas (SOCs), as they account for 80%-90% of these tumours and are the most aggressive.^(1, 2, 3) Advanced cases comprise more than 70% of all HGSOCs, and 5-year overall survival is only 30% for this group of patients.⁽³⁾ Low-grade serous ovarian carcinomas (LGSOCs), based on their indolent growth pattern, do not respond well to chemotherapy, but they have a better prognosis with significantly longer progression-free survival (PFS) rates.^(1, 3) The morphological aspects of SOCs and their histological grades provide important diagnostic information, but immunohistochemistry (IHC) is an important tool that is used in differential diagnosis and in the evaluation of molecular features, which further aids in the characterization of morphology and clinical behaviour.⁽⁴⁾

The Wilms Tumor 1 (*WT1*) gene, located on chromosome 11p13, was first identified as the gene responsible for the development of a childhood malignancy.⁽⁵⁾ However, *WT1* expression has also been demonstrated in various adult cancers.^(6, 7, 8) Its location in the female genital tract is usually used to distinguish SOC from other tumour types. Some studies have evaluated the immunoexpression of WT1 and its correlation with prognosis in ovarian cancer.⁽⁹⁻¹³⁾

TP53 gene encodes the 53-KDa nuclear protein that is responsible for maintaining the integrity of the genome via the induction of cellular apoptosis in cases of DNA damage.⁽¹⁴⁾ Mutations in the *TP53* gene may be suggested by IHC criteria. *TP53* gene mutations are present in nearly 100% of HGSOCs.⁽³⁾ Diffuse and strong nuclear expression or complete lack of expression (null type) are associated more with *TP53* mutations, whereas focal expression (wild type) is suggestive of the absence of mutations in HGSOC.^(4, 15, 16) LGSOCs are categorized by their low number of genetic mutations; for instance, *TP53* mutations are almost never present in these tumours.^(3, 17)

p16 is a protein encoded by the *CDKN2A* tumour suppressor gene. The p16 protein performs an important role in cell cycle regulation by decelerating cell progression from G1 to S phase.⁽¹⁸⁾ Approximately 60%-80% of HGSOCs show diffuse p16 staining,^(16, 19, 20) for this reason p16 in association with p53, are used as IHC markers in the differential diagnosis of SOCs.^(4, 21)

Recently, Köbel et al.⁽⁴⁾ proposed an association among WT1, p53 and p16 immunohistochemical expression in the differential diagnosis between LGSOC and HGSOC.

In the present study, we aimed to examine the diagnostic value of these markers, given that interobserver variability occurs in clinical practice, in the distinction between

LGSOC and HGSOC. We were then able to verify the immunohistochemical expression of WT1, p53 and p16 in SOC, in which the histological evaluation was clear, in a specialized gynaecological centre in Brazil. Moreover, we also determined the prognostic value of these markers.

Subjects and methods

Participants and tissue specimens

For this retrospective cohort study, we retrieved consecutive formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue samples and the accompanying clinical files of 138 women who were diagnosed and treated at the Women's Hospital of Campinas State University, Campinas, Brazil, from 1994 to 2013 and who were followed-up until 2016. The local institutional ethics committee (CEP 1086/2009) approved this study. All pathological specimens collected during primary surgery or before neoadjuvant chemotherapy were analysed by an expert gynaecological pathologist (L.A.) according to the guidelines of the World Health Organization (WHO) International Classification of Ovarian Tumours.⁽²¹⁾ Stage was classified according to FIGO recommendations and was updated and revised during data collection.⁽²²⁾ Exclusion criteria were as follows: second primary cancer (2 women), no available FFPE tissue sample before chemotherapy (22 women), misdiagnosis (2 women) and missing files (6 women). FFPE tissue samples from the remaining 21 cases of LGSOC and 85 cases of HGSOC with complete data were selected. The data were obtained from each patient's files. Women underwent chemotherapy regimens that consisted of carboplatin and either paclitaxel or cyclophosphamide according to the service protocols. For both the PFS and OS, the time was estimated in months, from the date of diagnosis to the last follow-up visit, recurrence or death.⁽²³⁾ The platinum response was classified as recommended by Patch et al.⁽²⁴⁾

Tissue microarray (TMA)

Slides from the original paraffin blocks were stained with haematoxylin and eosin (H&E) and were reviewed so that representative areas of the tumour could be identified. Tissue microarray blocks (TMA, Beecher Instruments Microarray Technology, Silver Spring, CA, USA) were constructed using two samples from each case. Sections were obtained from each TMA and were placed on electrically charged slides for all IHC procedures.

Immunohistochemistry (IHC)

After initial deparaffinization, endogenous peroxidase activity was blocked with 0.3% hydrogen peroxide. The sections were then microwaved in 10 mM citrate buffer (pH 6.0) or Tris-EDTA to unmask the epitopes. The slides were incubated with the following primary antibodies according to optimized protocols: monoclonal mouse anti-human Wilms Tumor 1 (WT1) protein (clone 6F-H2; DAKO Corporation, Carpinteria, CA, 1:100), monoclonal mouse anti-human p53 protein (Clone DO-7, DAKO Corporation, Carpinteria, CA, 1:500), and monoclonal mouse anti-p16 (CINtec® histology V-Kit, clone E6H4, Roche mtm laboratories AG, Germany). The peroxidase-labelled polymer ADVANCE™ HRP Detection System (Dako) was applied for 30 minutes at room temperature. The slides were subsequently washed in water, counterstained in haematoxylin, dehydrated and mounted. Tissue samples with adequate immunoreactivity were used as positive controls for each antibody. Negative controls were produced by omission of the primary antibodies.

Evaluation of the immunohistochemical reactions

A single gynaecological pathologist (L.A.) with expertise in ovarian cancer, who was blinded to the clinical and pathological data, scored the samples. Two TMA sets of each tumour component were used for each marker, i.e., each tumour area was assessed twice. The reactions were evaluated according to the percentage of positive cells. In a *post hoc* analysis, if scores differed in the two analyses, the stronger expression was considered.

Nuclear WT1 protein expression was analysed in each case, and the percentages of cells with nuclear staining were estimated independently of intensity. Cases with $\geq 1\%$ positive tumour nuclei were considered positive, and those with zero or less than 1% were considered negative.⁽²⁵⁾ Nuclear p53 protein expression was analysed in each case, and the percentages of cells with nuclear staining were estimated as follows: complete absence, focal nuclear staining in between $\geq 1\%$ and $< 70\%$ of tumour cells and diffuse nuclear staining in $\geq 70\%$ of tumour cells.^(4, 26, 27) Cytoplasmic and nuclear p16 staining were described as follows: expression was negative when $< 10\%$ of cells were stained, if no cells were stained or if cells were stained with low intensity; expression was focal when between 10% and 90% of cells were stained and was diffuse when $\geq 90\%$ of the cells were stained.⁽⁴⁾ Cases in which $\geq 90\%$ of cells were stained were considered positive, and cases in which $< 90\%$ of the cells were stained were considered negative (Figure 1).

We also performed a combined IHC classification proposed by Köbel et al.⁽⁴⁾ In this classification, which is termed the IHC p53/p16 index, a low-grade pattern was defined as p53 staining in $\geq 1\%$ and $< 70\%$ of cells and/or the complete absence of p53 associated with p16 staining in $< 90\%$ of cells. A high-grade pattern was defined as p53 staining in $\geq 70\%$ of cells (independent of p16) or the complete absence of p53 staining associated with p16 staining in $\geq 90\%$ cells. This approach was used to distinguish SOC on the exclusive basis of IHC, regardless of the morphological classification.

Statistical analyses

Differences between groups were analysed using the Chi-square test or Fisher's exact test. Continuous data were analysed using the Mann-Whitney test. Weighted Kappa was calculated to evaluate the IHC p53/p16 index with the morphological classification of the tumors. Progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) were measured from the time of diagnosis until relapse, progressive disease, or last follow-up, and from the time of diagnosis until death or last follow-up, respectively. PFS and OS probabilities were estimated by the Kaplan-Meier method, and curves were compared by the log-rank test. The Cox hazards model was used to identify variables that predicted PFS and OS. Variables for which $p \leq 0.10$ in the univariate Cox analysis were included in the multivariate Cox analysis. Differences were significant when $p < 0.05$.

Results

In this study, the main clinical and pathological features of 106 cases of SOC were recorded. Briefly, the sample was composed of 85 HGSOCS (80.2%) and 21 (19.8%) LGSOCs. Women with HGSOCS accounted for a significantly higher proportion of advanced stage disease (80.0% vs 42.9%, $p < 0.001$), presented with higher CA125 levels (median 954 U/ml vs 98 U/ml, $p < 0.001$), had a higher rate of post-surgery residual disease (53.0% vs 19.1%, $p < 0.01$) and had higher recurrence/progression rates (62.3% vs 23.8%, $p = 0.001$) compared with women with LGSOC. No association was observed between LGSOC and HGSOCS and age, menopausal status or response to platinum-based chemotherapy (Table 1).

WT1 was expressed in 71.4% of LGSOCs and in 57.1% of HGSOCS, and no significant difference was found in the expression of WT1 in these two tumour types ($p = 0.32$). p53 expression was diffuse in 68.2% of cases, was completely absent in 30.6% (totalling 98.8% of cases) and was focal in 1.2% of HGSOCS, compared with LGSOCs, which demonstrated diffuse expression in 9.5%, complete absence in 81.0% and focal

expression in 9.5% ($p<0.0001$). p16 was expressed in 58.5% of HGSOC samples compared with 9.5% of LGSOC samples ($p<0.001$). Table 2 shows that the IHC p53/p16 index and the morphological classification are closely matched. It is therefore possible to infer that both classifications can subdivide two distinct SOC subtypes ($p<0.0001$). Only two samples that were morphologically classified as LGSOC (9.5%) were also classified as HGSOC by the IHC p53/p16 index. On the contrary, 11.9% of HGSOCs that were classified as such on the basis of morphology, were reclassified as LGSOCs by the IHC p53/p16 index. When the IHC p53/p16 index and morphologic classification were compared, the kappa Cohen coefficient was moderate ($k=0.68$). A higher expression of p16 was seen in FIGO stage III and IV disease compared with FIGO stage I and II disease, and no difference was observed in p53 and WT1 expression according to stage (data not shown).

For the entire cohort, the median follow-up duration was 56 months (range: 1-213 months). At 60 months of follow-up, the PFS and OS were 37.1% and 50.9%, respectively. The PFS and OS were 73.0% and 83.1%, respectively, in women with LGSOC and 29.1% and 43.8%, respectively, in women with HGSOC (data not shown).

According to the univariate analysis, advanced FIGO stage and high tumour grade (morphological classification) were significantly associated with worse PFS and OS. The IHC p53/p16 index was associated with worse PFS (HR=2.23; 95%CI: 1.16-4.28) but only marginally with OS (HR=1.99; 95%CI: 0.98-4.08) (Table 3). WT1 expression was not associated with PFS or OS. After the multivariate analysis, FIGO stage and histological grade (morphological classification) remained independent prognostic factors for PFS. Women with advanced FIGO stage (III + IV) and HGSOC had a 3.29 (95%CI: 1.54-7.04) and a 2.37 (95%CI: 1.01-5.60) greater chance, respectively, of progression compared with women with FIGO stage I + II LGSOC. Only advanced FIGO stage remained a prognostic factor for worse OS (HR=3.01; 95%CI: 1.40-6.46). The IHC p53/p16 index was not an independent prognostic factor for either PFS or OS (Figure 2).

Discussion

The two types of SOC harbour different molecular abnormalities and have different clinical courses.⁽³⁾ These data from the literature were confirmed in our study. Women with HGSOC represented a worse prognosis, and higher CA125 levels compared with women with LGSOC.

We aimed to analyse the expression of WT1, p53 and p16 in LGSOC and HGSOC by IHC and to compare this expression with the pathological/clinical features of the

tumours and disease outcomes. We observed that the IHC p53/p16 index has a good association with the histopathological morphological classification. In the univariate analysis, the IHC p53/p16 index was associated only with PFS. After the multivariate analysis, FIGO stage remained the only independent prognostic factor for survival.

In the female genital tract, WT1 expression is usually used to distinguish SOC from other ovarian tumour types. In a recent review, Köbel et al.⁽⁴⁾ affirm that WT1 expression suggests SOC, considering that approximately 10% of HGSOCS can be negative. In our study, approximately 60% of all SOC expressed WT1 according to the same method described above.⁽⁴⁾ In the current study, WT1 expression was lower than what has been reported in most papers in the recent literature, which might be explained by the irregular staining of tissue for WT1, additionally, the TMAs used may not contain the most immunoreactive areas of the tumours.^(9, 28, 29)

In our study, p53 expression was diffuse in 68.2% and was completely absent (null type) in 30.6% of women with HGSOCS (totalling 98.8% of cases). Our results are similar to those of a previous study, which considered p53 expression by IHC (*TP53* mutations are present in nearly 100% of HGSOCS).^(3, 26, 30) p16-positive IHC expression (i.e., $\geq 90\%$ expression) was observed in 58.5% of women with HGSOCS, which is consistent with what has been reported in the literature.^(4, 21)

Recently, Köbel et al.⁽⁴⁾ concluded that their IHC p53/p16 index matched the standard pathological categorization of SOC and was reproducible. The IHC p53/p16 index aims to differentiate between LGSOC and HGSOCS using p53 and p16 IHC in WT1-positive samples. LGSOCs are characterized by the focal expression of both p53 and p16, whereas HGSOCS are defined as tumours with diffuse p53 expression or complete absence of p53 expression (null type) associated with diffuse p16 expression. In our study, only 1 case presented focal expression of both markers. This prompted us to also consider samples with focal and/or complete absence of p53 staining associated with negative p16 expression as LGSOC.⁽⁴⁾ In our study, we observed a close match between the morphological classification recommended by the WHO and the IHC p53/p16 index, principally in women with HGSOCS.

TP53 alterations are associated with high rates of tumour cell proliferation, but the association between p53 expression and patient prognosis remains controversial.⁽³¹⁾ In malignant tumours, p16 overexpression appears to be a mechanism by which the uncontrolled proliferation caused by failure of the Rb pathway can be arrested.⁽³²⁾ In our study, the IHC p53/p16 index was not significantly associated with survival.

Some important limitations of our research should be highlighted. First, our IHC evaluation was performed in TMA samples, and it is known that large ovarian cancers can show regional variability in the expression of protein markers. Indeed, IHC analyses were performed after a long period of time which means that the quality of the paraffin-embedded tissue might have been compromised. Second, the same cases that were included in our study were diagnosed almost 20 years ago. Herein, we divided our casuistry based on the diagnostic data: 1994 to 2003 (n=61) and 2004 to 2013 (n=45). No difference was observed in terms of the clinical features or survival (data not shown). Finally, our ratio of LGSOC to HGSOC is higher than that reported in the literature. This might be expected to occur once the majority of HGSOC cases present with advanced FIGO stages and are treated with neoadjuvant chemotherapy; these cases would thus be excluded from the study sample.

Conclusion

The IHC p53/p16 index and the morphological classification are closely matched, and the IHC p53/p16 index seems to be a good marker for the differentiation of LGSOC and HGSOC. However, the WHO morphologic classification showed a better association with survival. FIGO stage remained an independent prognostic factor for both PFS and OS. However, the IHC p53/p16 index was not an independent prognostic factor for either PFS or OS.

We suggested that the initial pathological approach in a new SOC case should begin with a WHO morphological study, while only doubtful cases should be subjected to IHC to determine the p53/p16 index. Thus, p53 and p16 expression have an important role in the routine differential diagnosis of ovarian carcinoma.

Acknowledgements

National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) number 306583/2014-3 and the São Paulo Research Foundation (FAPESP) number 2012/15059-8 funded this study.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Bodurka DC, Deavers MT, Tian C, Sun CC, Malpica A, Coleman RL, et al. Reclassification of serous ovarian carcinoma by a 2-tier system: A Gynecologic Oncology Group Study. *Cancer*. 2012, 118:3087-94.
2. Nik NN, Vang R, Shih IeM, Kurman RJ. Origin and pathogenesis of pelvic (ovarian, tubal, and primary peritoneal) serous carcinoma. *Annu Rev Pathol*. 2014, 9:27-45.
3. Kurman RJ, I-e Ming S. The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis. Revisit, Revised, and Expanded. *Am J Pathol*. 2016, 186:733-47
4. Köbel M, Bak J, Bertelsen BI, Carpen O, Grove A, Hansen ES, et al. Ovarian carcinoma histotype determination is highly reproducible, and is improved through the use of immunohistochemistry. *Histopathology*. 2014, 64:1004-13.
5. Pritchard-Jones, S. Fleming, D Davidson, W Bickmore, D Porteous, C Gosden, et al. The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. *Nature*. 1990, 346:194-97.
6. Koesters R, Linnebacher M, Coy JF, Germann A, Schwitalle Y, Findeisen P, et al. WT1 isa tumor-associated antigen in colon cancer that can be recognized by in vitro stimulated cytotoxic T cells. *Int J Cancer*. 2004, 109:385-92.
7. Silberstein GB, Van Horn K, Strickland P, Roberts CT Jr, Daniel CW. Altered expression of the WT1 wilms tumor suppressor gene in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997, 94:8132-37.
8. Nik SA, Hohenstein P, Jadidizadeh A, Van Dam K, Bastidas A, Berry RL, et al. Upregulation of Wilms' tumor gene 1 (WT1) in desmoid tumors. *Int. J. Cancer*. 2005, 114:202-8.
9. Netinatsunthorn W, Hanprasertpong J, Dechsukhum C, Leetanaporn R, Geater A. WT1 gene expression as a prognostic marker in advanced serous epithelial ovarian carcinoma: an immunohistochemical study. *BMC Cancer*. 2006, 6:90.
10. Høgdall EV, Christensen L, Kjaer SK, Blaakaer J, Christensen IJ, Gayther S, et al. Expression level of Wilms tumor 1 (WT1) protein has limited prognostic value in epithelial ovarian cancer: from the Danish "MALOVA" ovarian cancer study. *Gynecol Oncol*. 2007, 106:318-24.
11. Köbel M, Kalloger SE, Boyd N, McKinney S, Mehl E, Palmer C, et al. Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: implications for biomarker studies. *PLoS Med*. 2008, 5:232.

12. Liu Z, Yamanouchi K, Ohtao T, Matsumura S, Seino M, Shridhar V, Takahashi T, et al. High levels of Wilms' tumor 1 (WT1) expression were associated with aggressive clinical features in ovarian cancer. *Anticancer Res.* 2014, 34:2331-40.
13. Taube ET, Denkert C, Sehouli J, Kunze CA, Dietel Braicu I, Letsch A, et al. Wilms tumor protein 1 (WT1) – not only a diagnostic but also a prognostic marker in high-grade serous ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2016, 140:494-502.
14. Lee SH, Kim H, Kim WY, Han HS, Lim SD, Kim WS, et al. Genetic alteration and immunohistochemical staining patterns of ovarian high-grade serous adenocarcinoma with special emphasis on p53 immnnostaining pattern. *Pathol Int.* 2013, 63:252-9.
15. Canevari S, Gariboldi M, Reid JF, Bongarzone I, Pierotti MA. Molecular predictors of response and outcome in ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2006, 60:19-37.
16. O'Neill CJ, McBride HA, Connolly LE, Deavers MT, Malpica A, McCluggage WG. High-grade ovarian serous carcinoma exhibits significantly higher p16 expression than low-grade serous carcinoma and serous borderline tumour. *Histopathology.* 2007, 50:773-9.
17. Singer G, Stöhr R, Cope L, Dehari R, Hartmann A, Cao DF, et al. Patterns of p53 mutations separate ovarian serous borderline tumors and low- and high-grade carcinomas and provide support for a new model of ovarian carcinogenesis: a mutational analysis with immunohistochemical correlation. *Am J Surg Pathol.* 2005, 29:218-24.
18. Beirne JP, McArt DG, James JA, Salto-Tellez M, Maxwell P, McCluggage WG. p16 as a prognostic indicator in ovarian/tubal high-grade serous carcinoma. *Histopathology.* 2016, 68:615-8.
19. Phillips V, Kelly P, McCluggage WG. Increased p16 expression in high-grade serous and undifferentiated carcinoma compared with other morphologic types of ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Pathol.* 2009 Mar;28(2):179-86.
20. Yoon N, Yoon G, Park CK, Kim H Stromal p16 expression is significantly increased in malignant ovarian neoplasms *Oncotarget.* 2016; 7(40): 64665–64673.
21. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington S, Young RH. WHO classification of tumours of female reproductive organs. ed 4. Lyon, France, IARC, 2014.
22. Mutch DG, Prat J. 2014 FIGO staging for ovarian, fallopian tube and peritoneal cancer. *Gynecol Oncol.* 2014, 133:401-14.
23. Rustin GJ, Vergote I, Eisenhauer E, Pujade-Lauraine E, Quinn M, Thigpen T, et al. Definitions for response and progression in ovarian cancer clinical trials incorporating RECIST 1.1 and CA 125 agreed by the Gynecological Cancer Intergroup (GCIG). *Int J Gynecol Cancer.* 2011, 21:419-23.

24. Patch AM, Christie EL, Etemadmoghadam D, Garsed DW, George J, Fereday S, et al. Whole-genome characterization of chemoresistant ovarian cancer. *Nature*. 2015, 521:489-94.
25. Lee S, Piskorz AM, Le Page C, Mes Masson AM, Provencher D, Huntsman D, et al. Calibration and Optimization of p53, WT1, and Napsin an Immunohistochemistry Ancillary Tests for Histotyping of Ovarian Carcinoma: Canadian Immunohistochemistry Quality Control (CIQC) Experience. *Int J Gynecol Pathol*. 2016, 35:209-221.
26. Köbel M, Reuss A, du Bois A, Kommoss S, Kommoss F, Gao D, et al. The biological and clinical value of p53 expression in pelvic high-grade serous carcinomas. *J Pathol*. 2010, 222:191-98.
27. Kalloger SE, Köbel M, Leung S, Mehl E, Gao D, Marcon KM, et al. Calculator for ovarian carcinoma subtype prediction. *Mod Pathol*. 2011, 24:512-21.
28. Schorge JO, Miller YB, Qi LJ, Muto MG, Welch WR, Berkowitz RS, e cols. Genetic alterations of the WT1 gene in papillary serous carcinoma of the peritoneum. *Gynecol Oncol*. 2000;76(3):369-72.
29. Goldstein NS, Bassi D, Uzieblo A. WT1 is an integral component of an antibody panel to distinguish pancreaticobiliary and some ovarian epithelial neoplasms. *Am J Clin Pathol*. 2001;(2)116:246-52.
30. Chen S, Cavazza E, Barlier C, Salleron J, Filhine-Tresarrieu P, Gavoilles C. Beside P53 and PTEN: Identification of molecular alterations of the RAS/MAPK and PI3K/AKT signaling pathways in high-grade serous ovarian carcinomas to determine potential novel therapeutic targets. *Oncol Lett*. 2016, 12:3264-72.
31. Kmet LM, Cook LS, Magliocco AM. A review of p53 expression and mutation in human benign, low malignant potential, and invasive epithelial ovarian tumors. *Cancer*. 2003, 97:389-404.
32. Liew PL, Hsu CS, Liu WM, Lee YC, Lee YC, Chen CL. Prognostic and predictive values of Nrf2, Keap1, p16 and E-cadherin expression in ovarian epithelial carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015, 8:5642-9.
33. Yoon N, Yoon G, Park CK, Kim H Stromal p16 expression is significantly increased in malignant ovarian neoplasms *Oncotarget*. 2016 Oct 4; 7(40): 64665–64673.

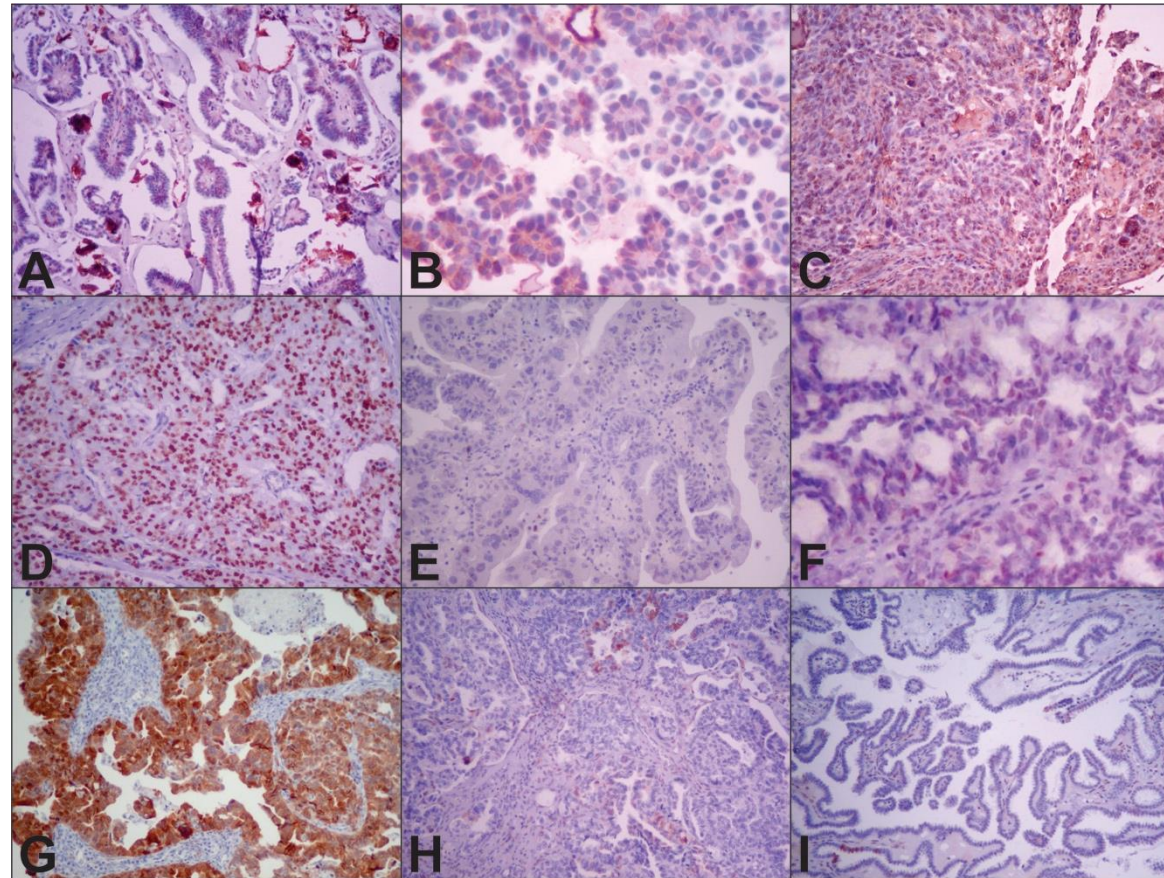


Figure 1. Representative WT1, p53 and p16 immunohistochemical expression in low- (LGSOC) and high-grade serous ovarian carcinoma (HGSOC).

Notes: A) positive expression of WT1 in LGSOC (10x); B) negative expression of WT1 in LGSOC (40x); C) positive expression of WT1 in HGSOC (10x); D) diffuse nuclear expression of p53 in HGSOC (10x); E) complete absence of p53 (null type) in HGSOC(10x); F) focal nuclear expression of p53 (wild type) in LGSOC (40x); G) positive nuclear and cytoplasmic expression of p16 in HGSOC (10x); H) negative (focal expression) of p16 in HGSOC (10x); I) negative (expression in only a few cells) of p16 in LGSOC (10x).

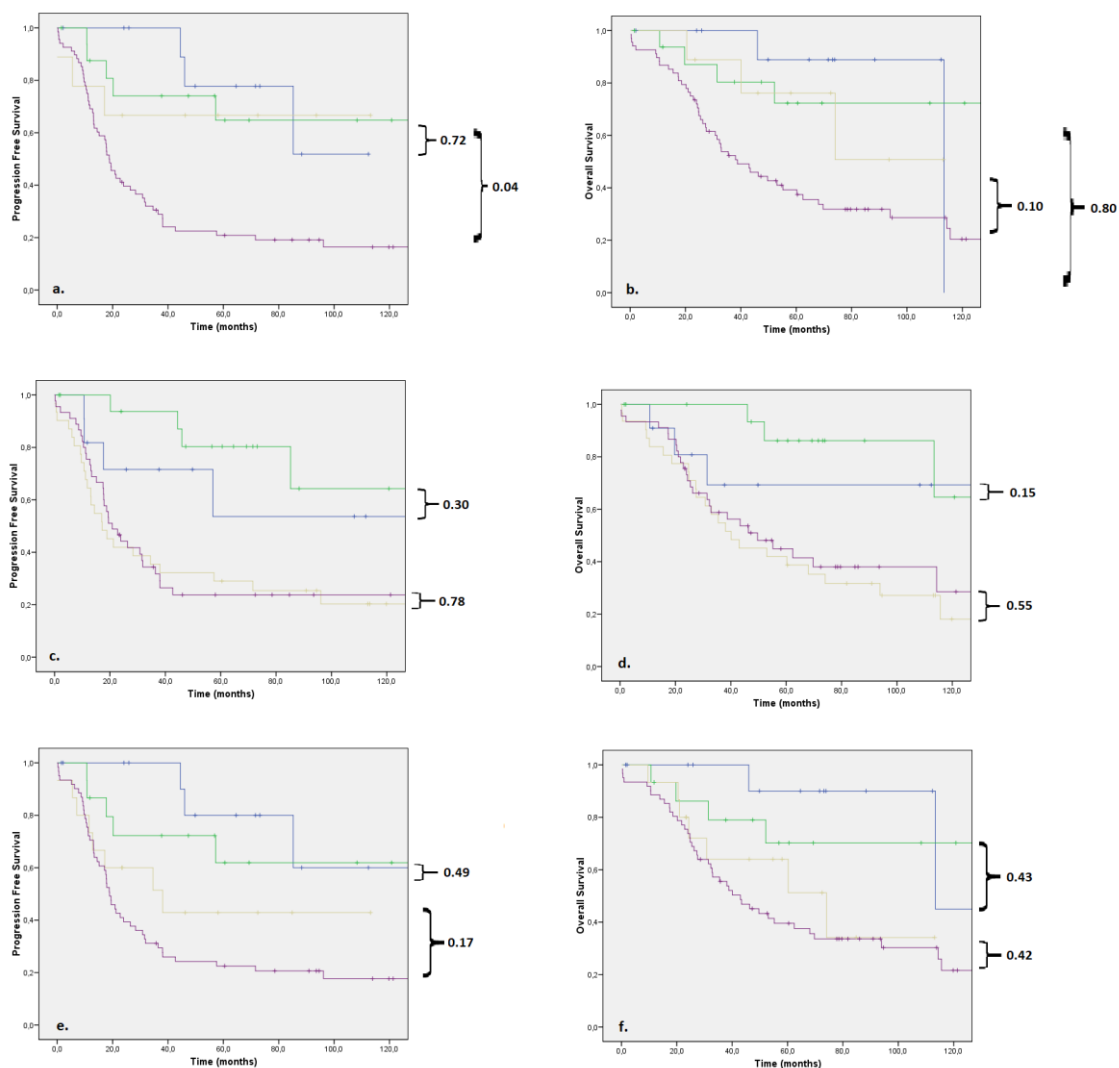


Figure 2. a) PFS and b) OS of women with LGSOC and HGSOc in initial and advanced disease stages based on morphological differentiation (WHO); c) PFS and d) OS of women with LGSOC and HGSOc in cases of negative and positive WT1 expression; e) PFS and f) OS of women with LGSOC and HGSOc in initial and advanced disease stages based on the immunohistochemical p53/p16 algorithm. All our analyses were performed in patients with stage I + II (blue and green lines) or in patients with stage III + IV (yellow and purple lines) disease.

Note: Blue line: LGSOC stage I + II; green line: HGSOc stage I + II; yellow line: LGSOC stage III + IV; purple line: HGSOc stage III + IV.

Table 1. Clinical features of women with low- and high-grade serous ovarian carcinomas

Clinical features	Low-grade serous ovarian carcinoma (LGSOC)	High-grade serous ovarian carcinoma (HGSOC)	p value
	n (%)	n (%)	
Age median (range), in years	55 (26-78)	59 (19-85)	0.83
Menopausal status			
pre-menopausal	6 (28.6)	20 (23.5)	0.78
post-menopausal	15 (71.4)	65 (76.5)	
FIGO staging			
I + II	12 (57.1)	17 (20.0)	<0.001
III + IV	9 (42.9)	68 (80.0)	
CA125 median (1st, 3rd quartile) in U/ml	98 (21; 378)	954 (194; 2248)	<0.001
Post-surgery residual disease			
no	17 (80.9)	40 (47.0)	<0.01
yes	4 (19.1)	45 (53.0)	
Response to platinum-based chemotherapy *			
Platinum-sensitive	10 (91.0)	41 (63.1)	0.09
Platinum-refractory/resistant	1 (9.0)	24 (36.9)	
Recurrence/disease progression †			
No	16 (76.2)	32 (37.7)	0.001
yes	5 (23.8)	53 (62.3)	

FIGO: The International Federation of Gynecology and Obstetrics; LGSOC: low-grade serous ovarian carcinoma; HGSOC: high-grade ovarian serous carcinoma; *6 LGSOC patients did not undergo chemotherapy because they were stage I FIGO, and 7 HGSOC patients did not undergo chemotherapy because they died; †women with acquired resistance were not included in this analysis; statistically significant differences are in bold, p values were calculated using the Chi square/Fisher exact test or the Mann-Whitney test.

Table 2. Comparison of tumour marker expression in low- and high-grade serous ovarian carcinomas according to morphological classification

Immunohistochemistry expression	Low-grade serous ovarian carcinoma (LGSOC) n (%)	High-grade serous ovarian carcinoma (HGSOC) n (%)	¹ p value
WT1 expression*			
negative	6 (28.6)	36 (42.9)	0.32
positive	15 (71.4)	48 (57.1)	
p53 expression			
≥1% and <70%	2 (9.5)	1 (1.2)	<0.0001
complete absence	17 (81.0)	26 (30.6)	
≥70%	2 (9.5)	58 (68.2)	
p16 expression†			
0 to < 90%	19 (90.5)	34 (41.5)	<0.001
≥90%	2 (9.5)	48 (58.5)	
IHC p53/p16 index			
low-grade pattern (p53 staining in ≥1% and <70% and/or p53 complete absence + p16 <90%)	19 (90.5)	10 (11.9)	² k=0.68
high-grade pattern (p53 ≥70% or p53 complete absence + p16 ≥90%)	2 (9.5)	74 (88.1)	p<0001

LGSOC: low-grade serous ovarian carcinoma; HGSOC: high-grade ovarian serous carcinoma; *1 woman with LGSOC, †3 women with HGSOC had missing data due to exhaustion of tumour material in the paraffin blocks; statistically significant differences are in bold; ¹p values were calculated using the Chi-square or Fisher exact test; ²Kappa Cohen.


Table 3. Survival analysis considering key clinical and pathological features

Clinical features	Progression-free survival			Overall survival		
	Number of relapses progression/total	HR (95%CI)	p value	Number of deaths/total	HR (95%CI)	p value
FIGO staging						
FIGO I+II	8/29	Reference		7/29	Reference	
FIGO III+IV	58/77	4.03 (1.91-8.47)	<0.001	50/X77	3.48 (1.57-.7.71)	0.002
Histological grade						
low histological grade	6/21	Reference		5/21	Reference	
high histological grade	60/85	3.38 (1.45-7.85)	0.005	52/85	2.95 (1.17-7.41)	0.02
WT1 expression						
negative	28/42	Reference		27/42	Reference	
positive	37/63	1.22 (0.75-2.01)	0.41	29/63	1.45 (0.86-2.46)	0.16
IHC p53/p16 index						
low-grade pattern (p53 staining in $\geq 1\%$ and $<70\%$ and/or p53 complete absence + p16 $<90\%$)	11/29	Reference		9/29	Reference	
high-grade pattern (p53 $\geq 70\%$ or p53 complete absence + p16 $\geq 90\%$)	54/76	2.23 (1.16-4.28)	0.01	47/76	1.99 (0.98-4.08)	0.05

FIGO: The International Federation of Gynecology and Obstetrics; PFS: progression-free survival; OS: overall survival; CI: Confidence interval; HR: Hazard ratio; statistically significant differences are indicated in bold. In the multivariate analysis, FIGO staging and histological grade were significantly associated with PFS; FIGO III + IV had an HR=3.29 (95%CI: 1.54-7.04) and high histological grade tumours had an HR=2.37 (1.01-5.60) and were more likely to progress compared with FIGO I + II and low histological grade tumours. Only FIGO staging remained associated with OS in a multivariate model (HR=3.01; 95%CI: 1.40-6.46).

4.2. Artigo 2 - BRCA1, Ki67 and β -catenin immunoexpression is not related to differentiation, platinum response or prognosis in women with low- and high-grade serous ovarian carcinoma

International Journal of **Gynecological Cancer**



HOME • LOG OUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW
MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Role: Author Username: derchain@fcm.unicamp.br

Submissions Being Processed for Author Sophie Derchain, MD, PhD

Page: 1 of 1 (1 total submissions)
Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
View Submission Author Status Send E-mail		BRCA1, Ki67 and β -catenin immunoexpression is not related to differentiation, platinum response or prognosis in women with low- and high-grade serous ovarian carcinoma	05/07/2017	05/07/2017	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions)
Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

BRCA1, Ki67 and β -catenin immunoexpression is not related to differentiation, platinum response or prognosis in women with low- and high-grade serous ovarian carcinoma

Luis Felipe Sallum¹, Lilitiana Andrade², Susana Ramalho¹, Amanda Canato Ferracini³, Rodrigo de Andrade Natal⁴, Angelo Borsarelli Carvalho Brito⁵, Luis Otávio Sarian¹, Sophie Derchain¹

¹ Department of Obstetrics and Gynecology, State University of Campinas, Campinas, Faculty of Medical Sciences, Campinas, São Paulo, Brazil.

² Department of Pathology, University of Campinas, Campinas, Faculty of Medical Sciences, Campinas, São Paulo, Brazil.

³ Program in Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, Faculty of Medical Sciences, Campinas, São Paulo, Brazil.

⁴ Laboratory of Investigative and Molecular Pathology, State University of Campinas, Campinas, Faculty of Medical Sciences, Campinas, São Paulo, Brazil.

⁵ Laboratory of Cancer Genetics, State University of Campinas, Campinas, Faculty of Medical Sciences, Campinas, São Paulo, Brazil.

Correspondence: Sophie Derchain. Department of Obstetrics and Gynecology – Faculty of Medical Sciences – State University of Campinas. Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Zip code: 13083-970 – Campinas, São Paulo, Brazil. Phone +55 19 35219305.

E-mail: derchain@fcm.unicamp.br

ABSTRACT

Objective: The purpose of this study was to compare the immunohistochemical expression of BRCA1, Ki67 and β -catenin in women with low-grade (LGSOC) and high-grade serous ovarian carcinomas (HGSOC), and their relationship with clinicopathological features, response to platinum-based chemotherapy and survival. **Methods:** For this study, 21 LGSOC and 85 HGSOC stage I-IV cases, diagnosed and treated from 1996 to 2013 and followed-up until December 2016, were included. BRCA1, Ki67 and β -catenin expression was assessed using tissue microarray-based (TMA) immunohistochemistry. **Results:** Women with HGSOC were significantly more likely to have advanced stage disease ($p<0.001$), higher CA125 levels ($p<0.001$), post-surgery residual disease ($p<0.01$), platinum based chemotherapy ($p<0.01$) and higher rates of disease progression and recurrence ($p=0.001$). The percentage of women with HGSOC whose tumors expressed Ki67 (55.9%) was significantly higher compared with women with LGSOC (9.5%) ($p<0.001$). The expression of BRCA1 (38.1% LGSOC and 21.7% HGSOC, $p=0.12$) and β -catenin did not differ between LGSOC and HGSOC (80.9% and 81.9%, respectively, $p=1.00$). The clinicopathological features and the response to platinum-based chemotherapy did not differ according to the BRCA1, Ki67 and β -catenin expression in either group. In the multivariate analysis FIGO stage, BRCA1, Ki67 and β -catenin were not associated with progression free survival (PFS) and overall survival (OS) in women with LGSOC. In women with HGSOC, only FIGO stage was independently associated with poor PFS and OS. **Conclusions:** Ki67 expression was significantly higher in HGSOC. BRCA1 and β -catenin expression did not differ between LGSOC and HGSOC samples. BRCA1, Ki67 and β -catenin expression was neither related to clinicopathological features, response to platinum-based chemotherapy nor survival. Only FIGO stage remained associated with poor survival in women with HGSOC.

Key words: Cystadenocarcinoma, serous, ovarian neoplasms, biomarkers, survival analysis, prognosis

Introduction

Ovarian cancers have the highest mortality rate among all gynecological cancers and are the fifth cause of cancer-related death in women.¹ In 2016, approximately 22.000 women were diagnosed with ovarian cancer, and more than 14.000 died of this disease in the USA.² In Brazil, 6.150 new cases were estimated in 2016, which corresponds to a risk of 6/100.000 women. In 2013, the mortality rate was 2.383 deaths.³ The most common form of ovarian carcinoma (OC) is the serous type, which can be subdivided into low- and high-grade serous ovarian carcinomas.⁴ High-grade serous ovarian carcinomas (HGSOCs) comprise most serous tumors, which account for 60% to 80% of cases of OCs and are the most aggressive. HGSOC are characterized at the molecular level by a high rate of *TP53* mutations and genomic instability.⁴ The 5-year overall survival (OS) rate is only 40%, which is primarily due to late-stage diagnoses, disease recurrence and resistance to platinum-based chemotherapy.^{4,5} However, the survival of those with advanced disease (FIGO III or IV) can be low as 13%.⁶ Low-grade serous ovarian carcinoma (LGSOC) seems to occur mainly in younger women and does not respond well to chemotherapy, but this subtype has a better prognosis.^{4,5} Approximately 10% of serous carcinomas are low-grade.

BRCA1/2 dysfunction frequently seen in HGSOC, often results from germline mutations, somatic mutations, and promoter methylation.^{7, 8} The Cancer Genome Atlas (TCGA) project reported that up to 50% of women with HGSOC may have homologous recombination repair deficiencies such as a *BRCA1/2* mutation.⁹ Germline mutations in *BRCA1/2* are detected in 14.5% of serous OC, methylation of the *BRCA1* promoter has been found in 11% of ovarian cancers, and somatic mutations of *BRCA1/2* have been found in 6% of HGSOC.^{7, 8} In women with mutations in *BRCA1*, the incidence of ovarian cancer occurs earlier in life, with a median age at diagnosis of approximately 40 years old.⁸ The *BRCA1/2* genes function as tumor suppressor genes that indirectly suppress neoplastic growth (cell cycle) because they encode proteins that are involved in the repair and maintenance of the integrity of the human genome (DNA). The *BRCA1* gene is located within the long arm of chromosome 17, and mutations in this gene are associated with an increased risk (55%-85%) of breast cancer and a 20% to 50% increased risk for ovarian cancer.^{7, 8, 10} Most of the ovarian carcinomas that present with *BRCA1* inactivation are HGSOC, and the presence of *BRCA1* inactivation does not appear to be associated with an increased risk for other histologic subtypes. The presence of *BRCA* germline mutations is associated with better survival outcomes compared with other HGSOCs that lack *BRCA* germline mutations.¹⁰ Although the mechanism related to the association between *BRCA1/2* germline mutations and survival is

not fully understood, *in vitro* experiments have shown that *BRCA1/2*-negative cells exhibit deficiencies in the repair of double-strand DNA breaks by homologous recombination. An inactivation of homologous recombination renders tumors with *BRCA1/2* mutations sensitive to platinum-based chemotherapy and targeted therapies, such as poly (ADP) ribose polymerase (PARP) inhibitors (polyADP-ribose polymerase), compared with tumors that lack *BRCA* mutations.¹¹ According to Garg et al., in that scenario, it is important to assess if immunohistochemistry (IHC) for BRCA1 is an accurate method for the detection of *BRCA1* dysfunction in women with serous OC, and if it should be used in the clinical setting to stratify patients for genetic testing.^{8, 11}

Ki67 is a nuclear protein that is closely linked to cell proliferation. It is expressed during all active phases of the cell cycle but is absent in resting cells.¹² Mitotic count is a traditional and practical method that is used to evaluate the proliferative activity of a tumor. The detection of cell proliferation by IHC is an alternative way to determine the proliferative potential of a tumor and its sensitivity to chemotherapy. The immunohistochemical expression of Ki67 has become widely used. However, data regarding Ki67 in ovarian cancer are limited, and the prognostic value of Ki67 expression in serous ovarian carcinoma remains controversial.^{12, 13}

The protein β -catenin, initially described as a component of cell-cell adhesive junctions, is regulated by its association with adenomatous polyposis coli (APC) and glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β)¹⁴. β -catenin is one of the components of the E-cadherin protein unit and is essential for differentiation and maintenance of normal tissue architecture. This protein also represents an important role in signal transduction, especially that of the Wnt signaling pathway. The β -catenin gene (*CTNNB1*) is located on chromosome 3p22, a region that is frequently changed in a variety of tumors. β -catenin gene mutations lead to the stabilization of this protein, which resists physiological degradation and is found in carcinomas.¹⁵ Study of colon cancer has shown that a mutation in either the APC or the β -catenin gene can result in an atypical accumulation of β -catenin within cells.^{15, 16} Dysregulation of the Wnt pathway results in the accumulation of β -catenin in the nucleus and cytoplasm and in the transcriptional activation of target genes. Aberrant accumulation of β -catenin correlates with tumor histological grade and poor survival.¹⁶ Dysregulation of Wnt/ β -catenin signaling also appears to be associated with the induction and maintenance of chemoresistance in OCs.¹⁷

However, data regarding BRCA1, Ki67 and β -catenin expression in ovarian serous carcinoma are limited, and the prognostic value of these markers remains controversial. The purpose of this study was to compare the IHC expression of BRCA1, Ki67

and β -catenin in women with LGSOC and HGSOC and their relationship with clinicopathological features, response to platinum-based chemotherapy and survival.

Subjects and methods

Participants and tissue specimens

For this reconstituted cohort study, the consecutive formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue samples and the respective files of 138 women who were diagnosed and treated at the Women's Hospital of Campinas State University, Campinas, Brazil from 1994 to 2013 and who were followed-up until December 2016 were selected. This study was approved by the local institutional ethics committee (CEP 1086/2009). All pathological specimens collected during primary surgery or before neoadjuvant chemotherapy were analyzed by an expert gynecological pathologist according to the guidelines of the World Health Organization International Classification of Ovarian Tumors according morphological parameters.¹⁸ The stage was classified according to FIGO recommendations.⁶ Exclusion criteria were as follows: presence of a second primary cancer (2 women), no available FFPE tissue sample before chemotherapy (22 women), misdiagnosis (2 women) and files not found (6 women). FFPE tissue samples from the remaining 21 women with LGSOC and 85 women with HGSOC with complete data were selected. Age, stage, CA125 level, post-surgery residual disease, cycles of chemotherapy, platinum response, progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) data were obtained from each patient's files. According to the hospital protocol, women with ovarian carcinoma underwent staging or debulking surgery (giving stage disease) followed by chemotherapy regimens with carboplatin and received either paclitaxel or cyclophosphamide. For PFS and OS, the time was estimated in months from the date of diagnosis to the last follow-up visit, recurrence or death.¹⁹ The median follow-up was 56 months (range: 1-213 months). In women with LGSOC, the median follow-up was 61 months (range: 2-114 months) and for those with HGSOC, 54 months (range: 1-213 months).

For platinum response, the time was estimated in months from the end of primary platinum-based chemotherapy treatment to the date of progression. The platinum response was classified as follows according to the guidelines recommended by Patch et al.: primary refractory were women who progressed during primary treatment; primary resistant were women who progressed less than six months after the end of primary treatment; primary chemosensitive women progressed six months after the end of primary treatment, and acquired resistant were women who failed to respond to chemotherapy for

progressed/relapsed disease and who previously demonstrated sensitivity to earlier lines of chemotherapy.²⁰ The progression/relapse was assessed through clinical evaluation, imaging and CA125 level.

Tissue microarray (TMA)

Slides from the original paraffin blocks were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and were reviewed to identify representative areas of the tumor. Tissue microarray blocks (TMA, Beecher Instruments Microarray Technology, Silver Spring, CA, USA) were constructed and consisted of two samples per case. Sections were obtained from each TMA on electrically charged slides for immunohistochemical procedures.

Immunohistochemistry (IHC)

After initial deparaffinization, endogenous peroxidase activity was blocked with 0.3% hydrogen peroxide. Sections were microwaved in 10 mM citrate buffer (pH 6.0) or Tris-EDTA to unmask the epitopes. The slides were incubated with the primary antibodies using optimized protocols (BRCA1, clone MS-110, Merck Millipore, Cambridge, MA, USA, 1:100; monoclonal mouse anti-human Ki67 antigen, clone MIB-1, Dako, Carpinteria, CA, USA, 1:500; monoclonal mouse anti-human β -Catenin, clone β -Catenin-1, Dako, Carpinteria, CA, USA, 1:100). A peroxidase-labelled polymer from the ADVANCE™ HRP Detection System (Dako) was applied for 30 minutes at room temperature. The slides were subsequently washed in water, counterstained with hematoxylin, dehydrated and mounted. Adequate immunoreactive tissue samples were used as positive controls for each antibody. Negative controls were produced by omission of the primary antibodies.

Evaluation of the immunohistochemical reactions

A single pathologist (LA) with significant expertise in gynecological pathology, who was blinded to the clinical and pathological data, scored the samples. Two TMA sets of each tumor component were used for each marker, i.e. each tumor area was assessed twice. The reactions were evaluated using a system based on the percentage of positive cells. If scores differed in the areas under evaluation, the areas with stronger expression were given preference.

BRCA1 and Ki67 expression was analysed for each case, and positive nuclear staining was estimated. Cases with more than 10% positive tumour nuclei independent of intensity were considered positive, whereas those with less than 10% positive tumour nuclei or 0% were considered negative.^{21, 22}

The β -catenin staining of the membrane, cytoplasm and nucleus, independent of percentage and intensity, was evaluated for each case.¹⁴ With respect to the statistical analysis, β -catenin expression was classified into 2 categories based on the combination of membranous, cytoplasmic and nuclear staining. Cases in the first category, which included cytoplasmic and/or nuclear with or without membranous staining independent of intensity, were classified as positive. Cases in the second category, which included only membranous staining independent of intensity or no staining were considered negative (figure 1).

Statistical analyses

Differences between groups were analyzed using Chi-square or Fisher's exact tests. Two-tailed *t*-tests were performed to compare IHC scores between groups of women. Continuous data were analyzed using the Mann-Whitney test. PFS and OS encompassed the time from diagnosis until relapse, progressive disease, death due to disease effects or the last follow-up, and the time from diagnosis until death by any cause or the last follow-up, respectively. PFS and OS probabilities were estimated by the Kaplan-Meier method, and curves were compared by the log-rank test. The Cox hazards model was used to identify variables that predict PFS and OS. Differences were significant when $p < 0.05$.

Results

As described in **table 1**, the mean age and menopausal status did not differ between women with LGSOC and HGSOC. Women with HGSOC were significantly more likely to present with advanced stage disease compared with women with LGSOC ($p < 0.001$) as well as a higher CA125 level ($p < 0.001$), post-surgery residual disease ($p < 0.01$) and platinum based-chemotherapy ($p < 0.01$). Although HGSOC has a higher indication of chemotherapy compared with LGSOC, the number of cycles of platinum ($p = 0.48$) and the response to platinum-based chemotherapy ($p = 0.16$) did not differ between the groups. Disease progression and recurrence were significantly higher in HGSOC ($p = 0.001$).

As described in **table 2**, the percentage of women with HGSOC that expresses Ki67 (55.9%) was significantly higher compared with the percentage of women with LGSOC (9.5%) ($p < 0.001$). The expression of BRCA1 (38.1% LGSOC and 21.7% HGSOC, $p = 0.12$) and β -catenin did not differ between LGSOC and HGSOC (80.9% and 81.9%, respectively, $p = 1.00$). β -catenin expression was predominantly localized in both the cytoplasm and the membrane. Only 1 case of LGSOC exhibited nuclear β -catenin staining (data not shown).

FIGO stage, post-surgery residual disease, number of platinum-sensitive tumors and tumors that were refractory/resistant to platinum, as well as disease progression and recurrence did not differ according to the expression of BRCA1, Ki67 and β -catenin in LGSOC and HGSOC (tables 3 and 4).

In the multivariate Cox proportional hazards models FIGO stage, BRCA1, Ki67 and β -catenin, were not associated with PF and OS in women with LGSOC. In women with HGSOC, only FIGO stage was independently associated with poor PFS (HR 3.95, CI95% 1.58-9.92, $p < 0.001$) and OS (HR 3.17, CI95% 1.25-8.05, $p = 0.01$) (table 5).

Discussion

In this sample of women with serous OCs, the mean age and menopausal status were not different between the LGSOC and HGSOC tumor groups. Women with HGSOC were significantly more likely to present with advanced stage disease, higher CA125 levels, post-surgery residual disease and platinum based-chemotherapy. HGSOC has a higher indication of platinum-based chemotherapy than LGSOC, but the response to chemotherapy did not differ between these groups. Disease progression and recurrence were significantly higher in cases of HGSOC. Ki67 expression was also significantly higher in HGSOC. *BRCA1* and β -catenin expression did not differ between LGSOC and HGSOC. β -catenin staining was predominantly localized to both the cytoplasm and the membrane. Stage and platinum response did not differ according to BRCA1, Ki67 and β -catenin expression in LGSOC and HGSOC. In the multivariate analysis, FIGO stage and histological grade, but not BRCA1, Ki67 or β -catenin expression, were found to be statistically significant factors related to poorer survival in serous OC.

It is already accepted that the histological types of ovarian carcinomas are generated through two distinct routes of tumorigenesis. Thus, it is possible to state that type I and type II tumors (low-grade and high-grade groups) are two distinct diseases. Type I carcinomas, which account for only 10% of deaths from ovarian cancer, are usually limited to the ovaries and have a good prognosis. Type II carcinomas are the most prevalent (70%), and women with these tumors present with advanced stage disease in more than 75% of such cases. This type is characterized at the molecular level by a high rate of *TP53* mutations and genomic instability; they also develop quickly and are highly aggressive.²² Type I tumors may develop from benign extra ovarian lesions, whereas most type II carcinomas develop from intraepithelial carcinomas of the fallopian tube (STIC). In our study, these differences were evident among the low-grade (type I) and high-grade (type II) serous OCs. More than 50% of

women with type I serous were diagnosed in the early stages, had lower levels of CA125, and more than 90% had no post-surgery residual disease or disease progression or recurrence. More than 80% of women with type II serous OC were diagnosed in advanced stages of the disease.²³ Currently, the standard treatment for women with clinically advanced ovarian cancer consists of surgical debulking combined with adjuvant and/or neoadjuvant treatment with platinum-based chemotherapy.²⁴ Improvements in surgical management and advances in cytotoxic therapy have been accomplished in the past several decades, but the overall 5-year survival rate of women with advanced disease can be low as 13%.⁶ In our study, according to the univariate (data not shown) and multivariate analyses, FIGO stage and histological grade were found to be statistically significantly associated with poorer survival in serous OCs. In HGSOC, only FIGO stage was associated with poorer survival.

In a case-control analysis Rubin et al., reported that *BRCA1/2* germline mutations were beneficial prognostic factors in women with ovarian carcinoma. Since then, many subsequent studies have attempted to uncover an association between *BRCA1/2* germline mutations and the prognosis of ovarian carcinomas, which has led to conflicting results.^{10, 25} In our study, *BRCA1* was not associated with survival in LGSOC and HGSOC.

Mutations in the *BRCA* genes occur in approximately 20% of HGSOC.⁷ In our study, 38.1% and 21.7% of the LGSOC and HGSOC, respectively, were positive for *BRCA1* expression ($p=0.12$). The results of the present study show lower *BRCA1* expression than do most of the studies in the current literature. Immunohistochemical studies may show results with low expression of *BRCA1*, depending on the affinity of the antibodies used and the tissue preservation. In addition, in a TMA study, reaction hot spots may have been missed. However, *BRCA1* is reported to be downregulated in 15% to 72% of sporadic ovarian cancer via epigenetic and transcriptional mechanisms.²¹ Therefore, *BRCA1* gene deficiency is significant in the pathogenesis of both sporadic and hereditary ovarian cancer. In addition, a significant decrease in *BRCA1* protein expression was observed in patients with advanced disease.²⁶

BRCA1 inactivation may be associated with chemosensitivity and a favorable prognosis in women with OC, although it is not currently known whether these features are restricted to patients with a *BRCA1* germline gene mutation.¹¹ This may be explained by the inability to repair double-strand DNA breaks induced by platinum-based chemotherapy.^{10, 27, 28} In addition, a deficiency in the *BRCA* gene is also known to confer sensitivity to poly (ADP) ribose polymerase (PARP) inhibitors (polyADP-ribose polymerase). In these cases, the *BRCA* status may guide post-operative treatment choice.^{28, 29}

In the study by Bolton et al., of the 3,879 women with ovarian carcinoma (pooled analysis of 26 observational studies) who were included, a better 5-year OS (HR=0.78; 95%CI, 0.68-0.89; $p<0.001$) was observed in women with *BRCA1* germline mutations (Bolton et al., 2012).³⁰ Tan et al., showed that women with *BRCA* expression had higher OS ($p=0.002$) and complete response rates ($p=0.004$) to first-line platinum-based chemotherapy as well as higher response rates to second- and third-line platinum-based chemotherapy ($p=0.004$ and $p=0.005$, respectively).²⁹ In the study by Gorodnova et al., complete clinical response was observed in 34% of women with *BRCA* mutations ($p<0.01$) who were treated with platinum-based neoadjuvant therapy.²⁸ Moreover, two recent meta-analyses showed that *BRCA1/2* carriers have a survival advantage, with a better OS and DFS compared with non-carriers.^{10, 31}

Whether the superior response to platinum-based chemotherapy translates into a better outcome is unclear. In the study by Gallagher et al., of all patients who began primary chemotherapy at Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC) for surgical stage III or IV OC, a better OS ($p=0.02$) but not a longer DFS ($p=0.3$), independent of primary platinum sensitivity, was observed in women with *BRCA* mutations (20 with *BRCA1* mutations and 16 *BRCA2* mutations) compared with those with sporadic cancers.³² Furthermore, in a study of a consecutive series of 125 women with ovarian cancer, Synowiec et al. observed a better OS in women with *BRCA1* germline mutations, which indicates that *BRCA1* germline mutations appear to be independent prognostic factors for ovarian cancer (HR 0.14, 95%CI 0.032-0.650, $p=0.012$).³³

In a recent study by Kotsopoulos et al., 1421 women with ovarian carcinomas were included. After 10 years of follow-up, 57% of *BRCA1* mutation carriers and 69% of *BRCA2* mutation carriers died from ovarian cancer, and no residual disease at resection was the strongest predictor of long-term survival ($p<0.0001$). According to Kotsopoulos et al. the initial survival advantage among women with *BRCA* mutations may reflect a higher initial sensitivity of *BRCA* carriers to chemotherapy, but this response does not predict long-term survival.³⁴ In agreement with this finding, McLaughlin et al. and Candido Dos Reis et al., observed a short-term survival advantage, but not a long-term survival benefit, for *BRCA* mutation carriers.^{35, 36} In the first study, within the 3-year period after diagnosis, the presence of a *BRCA1/2* mutation was associated with a better prognosis, but this effect was not observed 10 years after diagnosis.³⁵ In the second study, in 3,202 women with HGSOC, *BRCA1/2* mutations were found to be associated with better short term survival, but this

advantage decreased over time.³⁶ It appears that after a diagnosis of ovarian cancer, *BRCA* mutations, confer a transient decrease in mortality that diminishes with time.³⁴⁻³⁶

In addition, the data from the Cancer Genome Atlas (TCGA) project reported that only women with HGSOC and *BRCA2* mutations experienced improved survival (HR 0.33, 95%CI 0.16-0.69, $p=0.003$) and a higher primary chemotherapy sensitivity rate ($p=0.05$). However, *BRCA1* deficiency and longer platinum-free duration were not associated with these benefits (18.0 months for women with *BRCA2* mutations vs 12.5 months for women with *BRCA1* mutations, $p=0.04$).^{9, 27}

In contrast, previous studies found a worse outcome for women with *BRCA* mutations. However, their reliability has been questioned because the analyses were performed without stratification according to tumor stage.^{25, 37} Jo'annsson et al. analyzed the survival of 71 women with *BRCA1*-associated cancer (33 patients with breast cancer, 7 patients with breast and ovarian cancer, and 31 patients with ovarian cancer from 21 families with *BRCA1* germline mutations).²⁵ The results suggest that the survival of carriers of a *BRCA1* mutation may be similar or worse than that of women with breast and ovarian cancers in general. In a United Kingdom Coordinating Committee for Cancer Research (UKCCCR) Familial Ovarian Cancer Study Group, Pharoah et al., estimated the OS of 151 women from 57 families with *BRCA1/2* mutation-associated OC. They have shown that survival in cases of familial ovarian cancer is worse than that of sporadic cases, whether or not a *BRCA1/2* mutation is identified.³⁷

Gynecologic cancers are major therapeutic targets of platinum-containing regimens. They may be particularly susceptible to these agents if their origins are related to hereditary *BRCA* mutations; this implicates defective DNA repair as secondary to inherited alterations in *BRCA* function. If a *BRCA* mutation confers a better prognosis for patients with ovarian carcinoma or predicts improved response to certain chemotherapeutic agents, then this information may be useful for the clinician in planning the patient's treatment and in the selection of patients for clinical trials.³⁸

The prognostic value of Ki67 expression in serous OCs remains controversial, essentially because cut off points are not consensual. In our sample, we considered more than 10% stained nuclei, independent of the intensity, to be positive.²² In other studies, the cut-off for positivity varies from 5% to more than 50%.^{12, 39, 40} With our 10% cut-off, Ki67 expression was significantly higher in HGSOC than in LGSOC. In agreement with Chen et al., Feng et al. and Bachmayr-Heyda et al., we observed no relationship among Ki67 expression, stage, residual disease, recurrence or disease progression.^{12, 39, 40} Some studies

suggest that high expression of Ki67 is associated with worse survival since Ki67-positive tumors are highly proliferative. However, other studies have reported an association among Ki67 expression, better platinum response and favorable prognosis. In our study, platinum-sensitive or platinum-refractory/resistant LGSOC and HGSOC did not differ with respect to Ki67 expression. Chen et al., analyzed 318 women with HGSOC and reported that low Ki67 expression (<40% nuclei stained) was a predictor of platinum resistance (HR 2.85, 95% CI 1.43-5.98, $p < 0.001$), and comparisons of women with low versus high Ki67 expression demonstrated that low Ki67 expression was significantly associated with decreased PFS and OS, according to univariate and multivariate analyses.³⁹ Feng et al., studied 875 consecutive women with HGSOC and found that women whose tumors expressed Ki67 with 50% of the nuclei stained had a longer PFS ($p = 0.021$) and an improved OS ($p = 0.003$).¹² They also found that Ki67 expression was an independent predictor of platinum sensitivity (OR 0.632, 0.429-0.931, $p = 0.020$).¹⁶ Bachmayr-Heyda et al. analyzed 203 OCs including 179 advanced stage serous OCs and showed that women whose tumors expressed Ki67 in less than 5% of nuclei had a three times higher risk of death.⁴⁰

β -catenin membranous, cytoplasmic, and nuclear staining, independent of percentage and intensity, was evaluated as described by Lee et al.¹⁶ This study showed that positive immunostaining was predominantly localized in both the membrane and the cytoplasm. In our study, β -catenin staining was predominantly found in the cytoplasm or in the cytoplasm and membrane in both LGSOC and HGSOC. Lee et al. reported that nuclear expression of β -catenin was associated with high-grade tumors and worse median survival; no association was found between membrane or cytoplasmic staining and histological grade.¹⁶ However, in our study, β -catenin was expressed in the cytoplasm (with or without membrane staining) in 76.1% of LGSOCs and 81.9% of HGSOCs, but only 1 case expressed this marker in the nuclei. Wang et al. reported that β -catenin expression was not different between LGSOC and HGSOC. However, they concluded that overexpression was associated with advanced stages and poor OS. In our study, β -catenin expression was not associated with stage, histological grade, platinum chemotherapy or OS in LGSOCs or HGSOCs.¹⁴

The strength of this study is that it is the first investigation that correlated the IHC expression of BRCA1, Ki67 and β -catenin in response to platinum-based chemotherapy and prognosis in a selected sample of Brazilian woman with serous OCs. The main limitations of this study are its retrospective nature and immunohistochemical technique based on tissue microarray.

Conclusion

In summary, OCs appears to be a heterogeneous disease with different clinical outcomes. Women with HGSOC were significantly more likely to present with advanced stage disease, higher CA125 levels, and post-surgery residual disease and were significantly more likely to experience greater disease progression and recurrence. The cut-off value for marker expression, the histologic type, the chemotherapy response and the prognosis, as they relate to BRCA1, Ki67 and β -catenin IHC expression, are conflicting and are not consensual. Ki67 expression was significantly higher in HGSOC. In this study, stage and platinum response did not differ according to BRCA1, Ki67 and β -catenin expression in LGSOC and HGSOC. In the multivariate analyses, FIGO stage, BRCA1, Ki67 and β -catenin were not associated with PFS and OS in women with LGSOC. In women with HGSOC, only FIGO stage was independently associated with poor survival. The prognostic value of these markers deserves further exploration to personalize treatment options and targeted therapies.

Acknowledgements

The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) number 306583/2014-3 and the São Paulo Research Foundation (FAPESP) number 2012/15059-8 funded this study.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin.* 2015; 65(1):5-29.
2. American Cancer Society: Cancer Facts and Figures 2016. Atlanta, Ga: American Cancer Society, 2016. Available from: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/document/acspc-047079.pdf/>. Accessed November 26, 2016.
3. INCA - Instituto Nacional do Cancer, Coordenação Nacional de Prevenção e Vigilância do Câncer. Câncer no Brasil - Dados dos Registros de Base Populacional. Available from: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/ovario>. Accessed on November 26, 2016.
4. Kurman RJ, Shih IeM. The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded. *Am J Pathol.* 2016; 186(4):733-747.
5. Nik NN, Vang R, Shih IeM, et al. Origin and pathogenesis of pelvic (ovarian, tubal, and primary peritoneal) serous carcinoma. *Annu Rev Pathol.* 2014; 9:27-45.
6. Mutch DG, Prat J. 2014 FIGO staging for ovarian, fallopian tube and peritoneal cancer. *Gynecol Oncol.* 2014; 133(3):401-414.
7. Weissman SM, Weiss SM, Newlin AC. Genetic Testing by Cancer Site: Ovary. *Cancer J.* 2012; 18(4):320-327.
8. Garg K, Levine DA, Olvera N, et al. BRCA 1 immunohistochemistry in a molecular characterized cohort of ovarian high-grade serous carcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2013; 37(1):138-146.
9. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature.* 2011;474(7353):609-15.
10. Sun C, Li N, Ding D, Weng D, et al. The role of BRCA status on the prognosis of patients with epithelial ovarian cancer: a systematic review of the literature with a meta-analysis. *PLoS One.* 2014; 9(5):e95285.
11. Soslow RA, Han G, Park KJ, et al. Morphologic patterns associated with BRCA1 and BRCA2 genotype in ovarian carcinoma. *Mod Pathol.* 2012; 25(4):625-36.
12. Feng Z, Wen H, Bi R, et al. A clinically applicable molecular classification for high-grade serous ovarian cancer based on hormone receptor expression. *Sci Rep.* 2016; 6:25408.
13. Grabowski JP, Harter P, Heitz F, et al. Operability and chemotherapy responsiveness in advanced low-grade serous ovarian cancer. An analysis of the AGO Study Group metadatabase. *Gynecol Oncol.* 2016; 140(3):457-62.

14. Wang H, Wang H, Makki MS, et al. Overexpression of β -catenin and cyclinD1 predicts a poor prognosis in ovarian serous carcinomas. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013; 7(1):264-71.
15. Bhagat R, Premalata CS, Shilpa V, et al. Altered expression of beta-catenin, E-cadherin, and E-cadherin promoter methylation in epithelial ovarian carcinoma. *Tumour Biol*. 2013; 34:2459-68.
16. Lee CM, Shvartsman H, Deavers MT, et al. beta-catenin nuclear localization is associated with grade in ovarian serous carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2003; 88(3):363-8.
17. Rosanò L, Cianfrocca R, Tocci P, et al. A receptor/ β -arrestin signaling to the Wnt pathway renders ovarian cancer cells resistant to chemotherapy. *Cancer Res*. 2014; 74:7453-64.
18. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington S, et al. WHO classification of tumours of female reproductive organs. 4th ed. Lyon: France; 2014.
19. Rustin GJ, Vergote I, Eisenhauer E, et al. Definitions for response and progression in ovarian cancer clinical trials incorporating RECIST 1.1 and CA 125 agreed by the Gynecological Cancer Intergroup (GCIG). *Int J Gynecol Cancer*. 2011; 21(2):419-23.
20. Patch AM, Christie EL, Etemadmoghadam D, et al. Whole-genome characterization of chemoresistant ovarian cancer. *Nature*. 2015; 521:489-94.
21. Köbel M, Kalloger SE, Boyd N, et al. Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: implications for biomarker studies. *PLoS Med*. 2008; 5(12):232.
22. Carser JE, Quinn JE, Michie CO, et al. BRCA1 is both a prognostic and predictive biomarker of response to chemotherapy in sporadic epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* 2011; 123(3):492-98.
23. Kurman RJ, Shih IeM. The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded. *Am J Pathol*. 2016; 186(4):733-47.
24. Alkema NG, Wisman GB, van der Zee AG, et al. Studying platinum sensitivity and resistance in high-grade serous ovarian cancer: Different models for different questions. *Drug Resist Updat*. 2016; 24:55-69.
25. Jo´annsson OT, Rastam J, Borg A, et al. Survival of BRCA1 breast and ovarian cancer patients: a population-based study from southern Sweden. *J Clin Oncol*. 1998; 16(2):397-404.
26. Thrall M, Gallion HH, Kryscio R et al. BRCA1 expression in a large series of sporadic ovarian carcinomas: a Gynecologic Oncology Group study. *Int J Gynecol Cancer*. 2006; 16(1):166-71.
27. Cass I, Baldwin RL, Varkey T, et al. Improved survival in women with BRCA-associated ovarian carcinoma. *Cancer*. 2003; 97(9):2187-2195.

28. Gorodnova TV, Sokolenko AP, Ivantsov AO, et al. High response rates to neoadjuvant platinum-based therapy in ovarian cancer patients carrying germ-line BRCA mutation. *Cancer Lett.* 2015; 369(2):363-367.
29. Tan DS, Kaye SB. Chemotherapy for patients with BRCA1 and BRCA2-mutated ovarian cancer: same or different? *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2015:114-121.
30. Bolton KL, Chenevix-Trench G, Goh C, et al. Association between BRCA1 and BRCA2 mutations and survival in women with invasive epithelial ovarian cancer. *JAMA.* 2012; 307(4):382-390.
31. Zhong Q, Peng HL, Zhao X, et al. Effects of BRCA1- and BRCA2-related mutations on ovarian and breast cancer survival: a meta-analysis. *Clin Cancer Res.* 2015; 21:211-220.
32. Gallagher DJ, Konner JA, Bell-McGuinn KM, et al. Survival in epithelial ovarian cancer: a multivariate analysis incorporating BRCA mutation status and platinum sensitivity. *Ann Oncol.* 2011; 22(5):1127-1132.
33. Synowiec A, Wcisło G, Bodnar L, et al. Clinical features and outcomes of germline mutation BRCA1-linked versus sporadic ovarian cancer patients. *Hered Cancer Clin Pract.* 2016; 14:1.
34. Kotsopoulos J, Rosen B, Fan I, et al. Ten-year survival after epithelial ovarian cancer is not associated with BRCA mutation status. *Gynecol Oncol.* 2016; 140(1):42-47.
35. McLaughlin JR, Rosen B, Moody J. Long-term ovarian cancer survival associated with mutation in BRCA1 or BRCA2. *J Natl Cancer Inst.* 2013; 105(2):141-148.
36. Candido-dos-Reis FJ, Song H, Goode EL, et al Germline mutation in BRCA1 or BRCA2 and ten-year survival for women diagnosed with epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2015; 21:652-657.
37. Pharoah PD, Easton DF, Stockton DL, et al. Survival in familial, BRCA1-associated, and BRCA2- associated epithelial ovarian cancer United Kingdom coordinating committee for cancer res (UKCCCR) familial ovarian cancer study group. *Cancer Res.* 1999; 59(4):868-871.
38. Muggia F, Safra T. 'BRCAness' and its implications for platinum action in gynecologic cancer. *Anticancer Res.* 2014;34(2):551-556.
39. Chen M, Yao S, Cao Q, et al. The prognostic value of Ki67 in ovarian high-grade serous carcinoma: an 11-year cohort study of Chinese patients. *Oncotarget.* 2016.
40. Bachmayr-Heyda A, Aust S, Heinze G, et al. Prognostic impact of tumor infiltrating CD8+ T cells in association with cell proliferation in ovarian cancer patients--a study of the OVCAD consortium. *BMC Cancer.* 2013; 13:422.

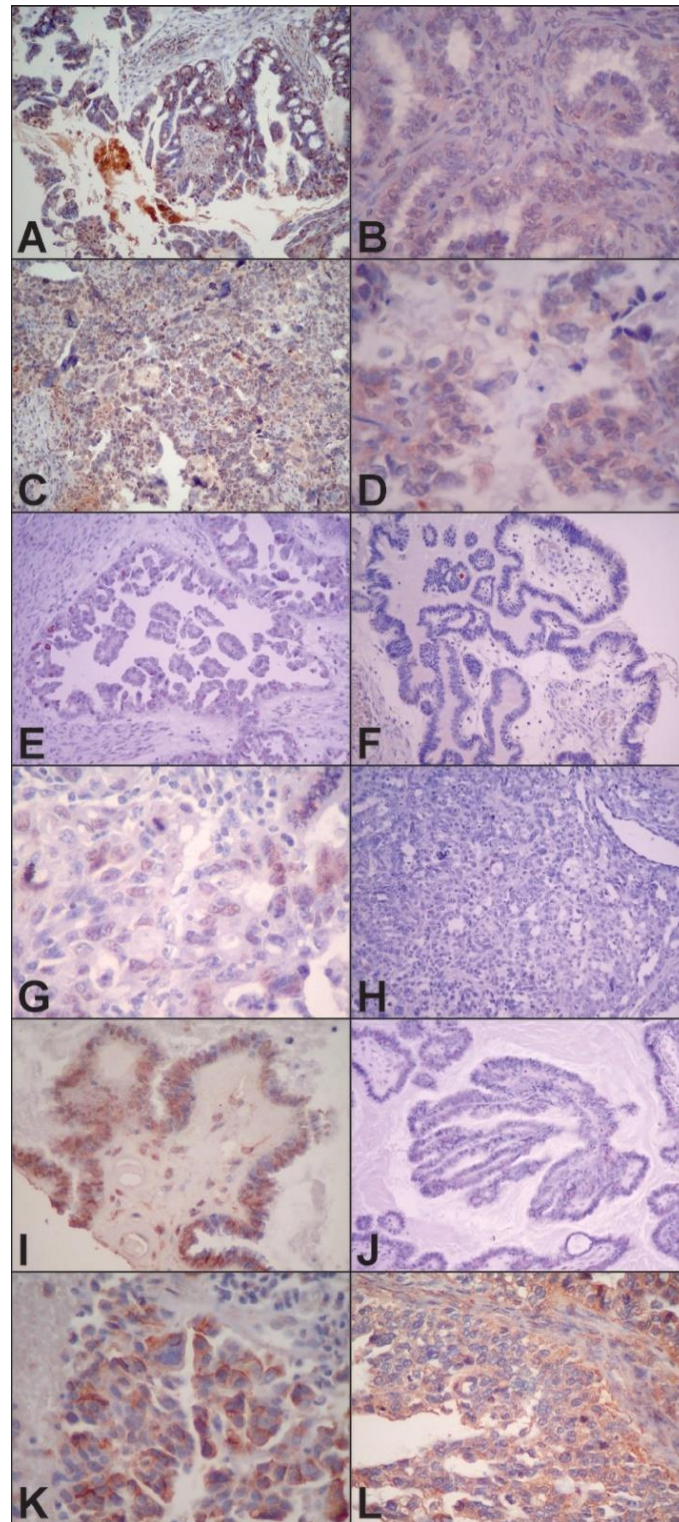


Figure1. Representative immunohistochemical expression of BRCA1, Ki67 and β -catenin in low-grade serous ovarian carcinoma (LGSOC) and high-grade serous ovarian carcinoma (HGSOC).

Notes: BRCA1 nuclear expression: A) BRCA1 positive in LGSOC (10x); B) BRCA1 negative in LGSOC (40x); C) BRCA1 positive in HGSOC (10x); D) BRCA1 negative in HGSOC (40x). Ki67 nuclear expression: E) Ki67 positive in LGSOC (10x); F) Ki67 negative in LGSOC (10x); G) Ki67 positive in HGSOC (40x); H) Ki67 negative in HGSOC (10x). β -catenin expression: I) β -catenin nuclear expression in LGSOC (positive expression) (40x); J) β -catenin negative expression in LGSOC (10x), K) β -catenin cytoplasm and membrane expression in HGSOC (positive) (40x); L) β -catenin membrane expression in HGSOC (negative) (40x).

Table 1. Clinical features of women with low- and high-grade serous ovarian carcinomas

Clinical features	Low-grade serous ovarian carcinoma (LGSOC)		High-grade serous ovarian carcinoma (HGSOC)		p
	n	(%)	n	(%)	
Age (years) (Mean \pm standard deviation)	56.7 (+/- 15.1)		57.5 (+/-12.7)		0.84 ^b
Menopausal status					
pre-menopausal	6	(28.6)	20	(23.5)	0.78 ^c
post-menopausal	15	(71.4)	65	(76.5)	
Stage (FIGO)					
I	11	(52.4)	8	(9.4)	<0.001 ^c
II	1	(4.8)	9	(10.6)	
III	9	(42.9)	63	(74.1)	
IV	-	-	5	(5.9)	
CA125 U/ml (Mean \pm standard deviation)	1033 (+/-3471)		2543 (+/-5920)		<0.001 ^d
Post-surgery residual disease					
no	17	(80.9)	40	(47.0)	<0.01 ^c
yes	4	(19.1)	45	(53.0)	
Platinum based chemotherapy ^a					
no	6	(28.6)	7	(8.2)	<0.01 ^e
yes	15	(71.4)	78	(91.8)	
Cycles of platinum					
0-1	-	-	1	(1.3)	0.48 ^e
2 to 5	-	-	6	(7.7)	
>= 6	15	(100.0)	71	(91.0)	
Response to platinum chemotherapy (92 patients with >=2 cycles)					
refractory	1	(6.7)	7	(9.1)	0.16 ^c
primary resistant	-	-	17	(22.1)	
sensitive	10	(66.7)	41	(53.3)	
acquired resistance	4	(26.6)	12	(15.5)	
Disease progression and recurrence					
no	16	(76.2)	32	(37.7)	0.001 ^c
yes	5	(23.8)	53	(62.3)	

Notes: ^a6 LGSOC patients did not undergo chemotherapy because they were FIGO stage I, and 7 HGSOC patients did not undergo chemotherapy because they died; statistically significant differences are shown in bold; p calculated using. ^bT-Test. ^cFisher Exact Test. ^dMann-Whitney Test. ^eChi-square Test.

Abbreviations: FIGO, The International Federation of Gynecology and Obstetrics.

Table 2. Expression of tumor markers in low- and high-grade serous ovarian carcinomas

IHC expression	Low-grade serous ovarian carcinoma (LGSOC)		High-grade serous ovarian carcinoma (HGSOC)		p
	n	(%)	n	(%)	
BRCA1 expression ^a					
negative	13	(61.9)	65	(78.3)	0.12 ^c
positive	8	(38.1)	18	(21.7)	
Ki67 expression ^b					
negative	19	(90.5)	37	(44.1)	<0.001^d
positive	2	(9.5)	47	(55.9)	
β-catenin expression ^a					
negative	4	(19.1)	15	(18.1)	1.00 ^c
positive	17	(80.9)	68	(81.9)	

Notes: ^a2 missing data for HGSOC, ^b1 missing data for HGSOC, missing data for these biomarkers were due to an exhaustion of tumor material in the paraffin blocks; ^cChi-square Test; ^dFisher Exact Test; bold values indicate statistically significant differences.

Table 3. FIGO stage, platinum response and BRCA1, Ki67 and β -catenin expression in 15 women with low-grade serous ovarian carcinomas who underwent at least 2 cycles of platinum therapy

	Low-grade serous ovarian carcinoma														
	BRCA1					Ki67					β-catenin				
	negative		positive		p ^a	negative		positive		p ^a	negative		positive		
	n	(%)	n	(%)		n	(%)	n	(%)		n	(%)	n	(%)	p ^a
FIGO stage															
I+II	2	(25.0)	4	(57.1)		6	(42.9)	-	-		-	-	6	(46.1)	
III+IV	6	(75.0)	3	(42.9)	0.31	8	(57.1)	1	(100)	1.00	1	(100)	7	(53.9)	1.00
Post-surgery residual disease															
no	5	(62.5)	6	(85.7)		11	(78.6)	-	-		2	(100.0)	9	(69.2)	
yes	3	(37.5)	1	(14.3)	0.56	3	(21.4)	1	(100)	0.26	-	-	4	(30.8)	1.00
response to chemotherapy															
Platinum-sensitive	5	(100)	5	(83.3)		10	(90.9)	-	-		2	(100.0)	8	(88.9)	
Platinum-refractory/resistant	-	-	1	(16.7)	1.00	1	(9.1)	-	-	1.00	-	-	1	(11.1)	1.00
Disease progression and recurrence															
no	5	(62.5)	5	(71.4)		10	(71.4)	-	-		2	(100.0)	8	(61.5)	
yes	3	(37.5)	2	(28.6)	1.00	4	(28.6)	1	(100)	0.33	-	-	5	(38.5)	0.52

Notes: ^aFisher Exact Test; women with acquired resistance were not included in this analysis.

Abbreviations: FIGO, The International Federation of Gynecology and Obstetrics.

Table 4. FIGO stage, platinum response and BRCA1, Ki67 and β -catenin expression in 77 women with high-grade serous ovarian carcinoma who underwent at least two cycles of platinum therapy

	High-grade serous ovarian carcinoma														
	BRCA1 ^c					Ki67 ^d					β-catenin ^c				
	negative		positive		p	negative		positive		p	negative		positive		
	n	(%)	n	(%)		n	(%)	n	(%)		n	(%)	n	(%)	p
FIGO stage															
I+II	12	(20.7)	4	(23.5)		7	(21.2)	9	(20.9)		3	(21.4)	13	(21.3)	
III+IV	46	(79.3)	13	(76.5)	0.74 ^a	26	(78.8)	34	(79.1)	1.00 ^a	11	(78.56)	48	(78.7)	1.00 ^b
Post-surgery residual disease															
no	30	(51.7)	5	(29.4)		13	(39.3)	22	(51.1)		4	(28.5)	31	(50.8)	
yes	28	(48.3)	12	(70.6)	0.16 ^a	20	(60.7)	21	(48.9)	0.35 ^a	10	(71.5)	30	(49.2)	0.15 ^a
Platinum-sensitive	31	(64.6)	10	(71.4)		15	(62.5)	26	(66.7)		10	(76.9)	31	(63.3)	
Platinum-refractory/resistant	17	(35.4)	4	(28.6)	0.75 ^b	9	(37.5)	13	(33.4)	0.11 ^a	3	(23.1)	18	(36.7)	0.51 ^b
Disease progression and recurrence															
No	21	(36.2)	5	(29.4)		8	(24.2)	18	(41.8)		6	(42.8)	20	(32.7)	
Yes	37	(63.8)	12	(70.6)	0.77 ^a	25	(75.8)	25	(58.2)	0.14 ^a	8	(57.2)	41	(67.3)	0.53 ^a

Notes: ^aChi-square Test. ^bFisher Exact Test, women with acquired resistance were not included in this analysis. ^c 2 missing data. ^d1 missing data, missing data for these biomarkers were due to an exhaustion of tumor material in the paraffin blocks.

Abbreviations: FIGO, The International Federation of Gynecology and Obstetrics.

Table 5. Multivariate analysis of potential prognostic factors for progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) in women with low- and high-grade serous ovarian carcinomas^a

	Low-grade serous ovarian carcinoma					
	PFS			OS		
	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
FIGO I + II		Reference			Reference	
FIGO III + IV	1.52	0.30-7.55	0.60	3.73	0.38-36.08	0.25
BRCA1-negative		Reference			Reference	
BRCA1-positive	1.11	0.15-5.12	0.90	1.20	0.07-8.98	0.88
Ki67-negative		Reference			Reference	
Ki67-positive	4.16	0.37-46.20	0.24	8.69	0.52-144	0.13
β -catenin-negative		Reference			Reference	
β -catenin-positive	32.9	0.01-97.69	0.98	31.4	0.01-97.69	0.97

	High-grade serous ovarian carcinoma					
	PFS			OS		
	HR	IC 95%	p	HR	IC 95%	p
FIGO I + II		Reference			Reference	
FIGO III + IV	3.95	1.58-9.92	<0.001	3.17	1.25-8.05	0.01
BRCA1-negative		Reference			Reference	
BRCA1-positive	1.01	0.53-1.92	0.96	1.25	0.61-2.53	0.53
Ki67-negative		Reference			Reference	
Ki67-positive	1.11	0.53-1.92	0.69	1.03	0.59-1.79	0.91
β -catenin-negative		Reference			Reference	
β -catenin-positive	1.56	0.76-3.19	0.21	1.64	0.75-3.58	0.20

Notes: all women with tumor markers, bold values indicate statistically significant differences.

Abbreviations: PFS, progression-free survival; OS, overall survival; CI, confidence interval; HR, hazard ratio; OC, ovarian carcinoma.

5. DISCUSSÃO GERAL

Em nosso estudo foram incluídas as mulheres com carcinoma seroso de ovário de baixo e alto grau independente do estágio ao diagnóstico. Avaliamos alguns biomarcadores tanto de diferenciação como de proliferação celular que poderiam auxiliar no diagnóstico diferencial entre os outros subtipos histológicos de COs, e serem possíveis marcadores de prognóstico ou quimioresistência à platina. Optamos pela IHQ por ser uma técnica acessível aos patologistas e validada para o CO, que apresenta custo baixo e fácil reprodutibilidade com boa acurácia diagnóstica e concordância interobservador (Rosen e cols., 2004).

As neoplasias ovarianas têm origem em diferentes tipos celulares e englobam uma variedade de grupos histológicos. Os COs são os mais frequentes e responsáveis pela maioria dos óbitos relacionados à doença (Braicu e cols., 2011; SEER Program, 2015). Aproximadamente 2/3 dos COs são diagnosticados em estádios avançados, para os quais a sobrevida média livre progressão não ultrapassa 18 meses. Apesar dos avanços nos tratamentos cirúrgicos e antitumorais, a taxa de cura não apresentou uma melhora significativa nas últimas duas décadas. Nos últimos anos, a sobrevida das mulheres com CO permaneceu praticamente estável e a pouca melhora que ocorreu não se deveu ao diagnóstico mais precoce da doença, mas aos esquemas de quimioterapia baseados em platina nestes anos (Huang e cols., 2008).

A sobrevida e consequentemente as recidivas precoces estão diretamente relacionadas ao estágio, tipo e grau histológico, e presença de doença residual após cirurgia. Na recidiva, o principal fator prognóstico é o intervalo livre de doença após o uso de platina, que determina a sensibilidade ou resistência do tumor, sendo a resistência à platina o fator mais importante de pior prognóstico (Berns e cols., 2012). Até o momento não existem biomarcadores que identifiquem precocemente a resistência ao tratamento e que possam direcionar o tratamento e o desenvolvimento de novas drogas (Sölétormos e cols., 2016; USPSTF, 2016).

Ao relacionarmos o grau histológico com as características clínicas das mulheres observamos que as pacientes com CSOAG apresentaram doença em estádios mais avançados ao diagnóstico (80% das mulheres no estágio III e IV), maiores níveis séricos de CA125, maior proporção de doença residual pós-cirúrgica, e maiores taxas de progressão e recorrência quando comparada às mulheres com CSOBG. Estes dados foram concordantes com a literatura, uma vez que as mulheres com diagnóstico de CSOAGs apresentaram características

clínicas e fatores de pior sobrevida, o que valida nossa amostra e também a classificação morfológica entre os carcinomas serosos de ovário (Kurman e cols., 2016).

Utilizamos os critérios morfológicos preconizados pela OMS (Kurman e cols., 2014) para classificar as neoplasias das mulheres em carcinomas serosos de baixo e alto grau. Segundo esta classificação da OMS, usam-se parâmetros morfológicos como atividade celular, atipia nuclear e índice mitótico para a diferenciação entre os COs.

Não há consenso na literatura quanto à diluição e o valor de corte para a reação e leitura IHQ da WT1. Diferentes resultados são relatados com expressões variando entre 50% a 93% das mulheres com carcinomas serosos de ovário. Netinatsunthorn e cols. (2006) descrevem que aproximadamente 50% dos CSOAGs em estádios avançados apresentam expressão da WT1. Goldstein e cols. (2001) observaram que 93% das mulheres com carcinomas serosos de ovário apresentaram expressão da WT1. Schorge e cols. (2000) diferentemente dos outros autores, relatam que a ausência da expressão da WT1 ocorreu em 53% dos carcinomas serosos de ovário.

Os resultados publicados em relação à expressão do WT1 e prognóstico nos COs também são conflitantes, sendo que em alguns artigos esteve relacionado a um melhor prognóstico (Köbel e cols., 2008; Taube e cols., 2016), em outros foi um fator prognóstico desfavorável (Netinatsunthorn e cols., 2006; Liu e cols., 2014), e em outro, não esteve relacionado com a sobrevida (Høgdaal e cols., 2007). Estes dados conflitantes ocorreram provavelmente, pois nestes trabalhos utilizaram-se coortes compostas com diversos subtipos histológicos de COs.

Em nosso estudo, com uma coorte composta apenas por carcinomas serosos de ovário, analisados separadamente entre serosos de baixo e alto grau, observamos que a expressão do WT1 não esteve relacionada à SLP e SG tanto nas mulheres com carcinoma seroso de baixo ou de alto grau.

Sabe-se que a classificação morfológica dos COs não é simples e a concordância interobservador pode ser relativamente baixa. Baseando-se nisso, Köbel e cols. (2014) publicaram recentemente um estudo no qual utilizaram alguns marcadores imuno-histoquímicos na avaliação de 54 mulheres com carcinoma seroso de ovário. Os autores propõem um algoritmo utilizando critérios imuno-histoquímicos e não morfológicos, para diferenciar os subtipos histológicos dos COs (serosos de baixo e alto grau, endometrióides, mucinosos e células claras). De acordo com este algoritmo imuno-histoquímico (Köbel e cols., 2014) (**figura1**) a expressão do WT1 seria o marcador que diferenciaria os carcinomas serosos dos outros COs, porém não fica claro neste estudo qual é porcentagem de carcinomas

serosos que apresentaram esta expressão. Num estudo anterior, o mesmo (Köbel e cols., 2008) descreveram uma expressão da WT1 em 80% das mulheres com carcinoma seroso de ovário. Inicialmente utilizamos como corte 10% dos núcleos corados, e com este critério a expressão da WT1 nos carcinomas serosos ficou em torno de 50%. Depois, as lâminas do *TMA* foram reavaliadas considerando a expressão da WT1 conforme proposto recentemente por Köbel e cols. (2014) (>1% dos núcleos corados independente da intensidade) e com essa nova leitura, obtivemos uma expressão positiva da WT1 em torno de 60% nos carcinomas serosos de ovário, sendo 71,4% nos CSOBGs e 57,1% nos CSOAGs. A expressão da WT1 foi menor do que a descrita por Köbel e cols. (2014), apesar de utilizarmos a mesma categorização proposta pelos autores, isso talvez poderia ser explicado uma vez que a expressão IHQ da WT1 seria irregular no tecido, e a técnica do *TMA* pode não demonstrar todos os *hot spots* desta reação.

No nosso estudo a expressão da WT1 não apresentou diferenças significativas entre os carcinomas serosos de ovário de alto e baixo grau.

Ainda, de acordo com o algoritmo imuno-histoquímico, a diferenciação do grau entre os carcinomas serosos baseia-se na expressão IHQ da p53 e da p16. De acordo com este algoritmo imuno-histoquímico, para caracterização como CSOAG é necessário apresentar expressão difusa da p53 ou ausência de expressão da p53 associada à expressão difusa da p16, enquanto que, os CSOBGs apresentam expressão focal tanto da p53 como da p16 (**figura 1**).

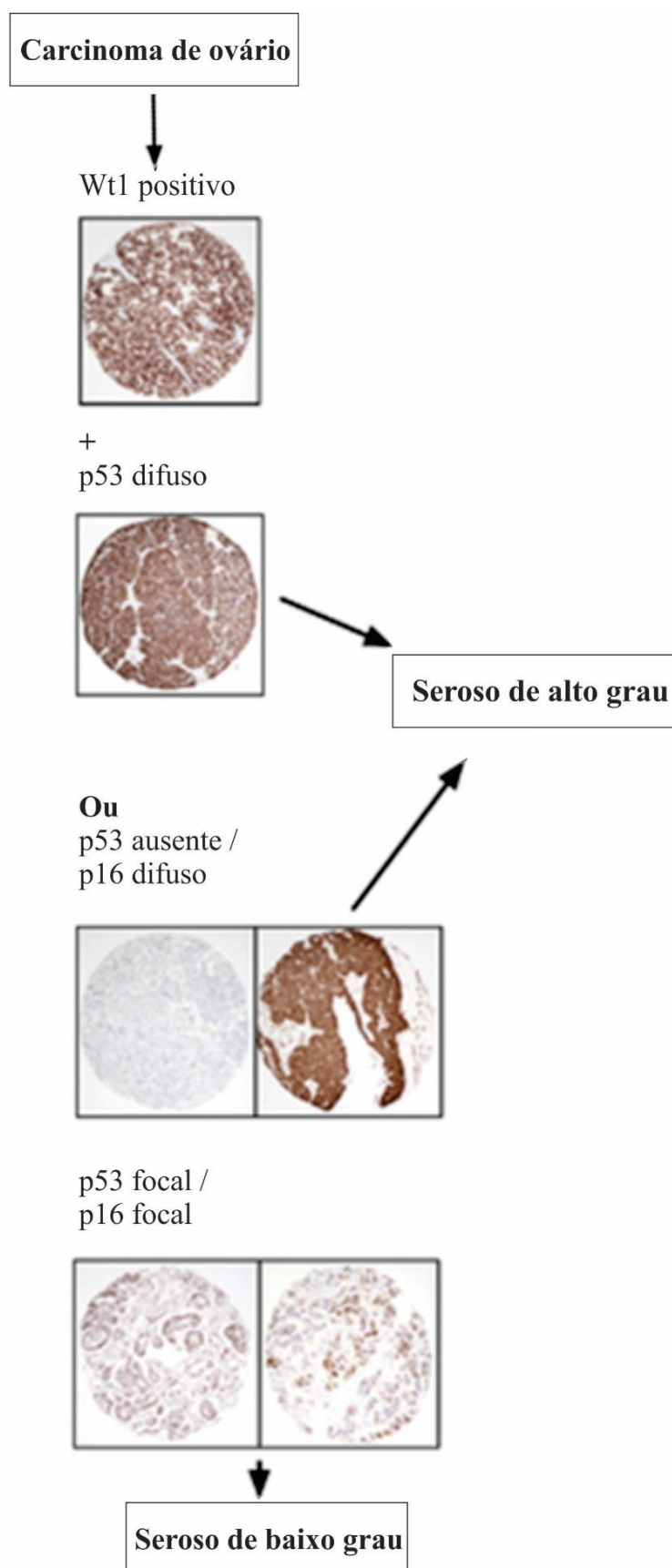


Figura 1. Algoritmo imuno-histoquímico proposto para categorização imuno-histoquímica entre os carcinomas de ovário segundo Köbel et al., 2014 (modificado) (**anexo 4** - autorização nº. 4102110246394)

Nos CSOAG dependendo do tipo de mutação, a expressão IHQ da p53 pode estar expressa na maioria das células (forte e difusa) ou estar totalmente ausente (*null type*), enquanto que, a expressão fraca e focal constitui o chamado *wild type* sem relação com a mutação do gene *P53* (O'Neill e cols., 2007; Köbel e cols., 2014). Köbel et al. (2010) observaram que a expressão da p53 foi difusa em 57,7% e completamente ausente em 30,3% das mulheres com CSOAG (Köbel e cols., 2010). Recentemente, Chen^b e cols. (2016) observaram a expressão p53 difusa em 67% das mulheres com CSOAG e a ausência completa em 33%. Em nosso estudo, a expressão da p53 foi positiva em 68,2% (difuso) e completamente ausente em 30,6% das mulheres com CSOAG (totalizando 98%), diferentemente dos casos de CSOBG em que a p53 foi positiva em 9,5% das mulheres, o que é concordante com o descrito na literatura.

A expressão da p16 foi analisada em alguns estudos e pela OMS, e observaram que aproximadamente 60% dos CSOAGs apresentavam expressão difusa da p16 (Kurman e cols., 2014). Em nosso estudo a expressão da p16 foi positiva (difusa) em 58,5% das mulheres com CSOAG, o que é concordante com a literatura. Em nosso estudo também comparamos a expressão da p16 de acordo com o estágio, e observamos uma maior expressão nos estágios avançados (III e IV).

Ao analisarmos o algoritmo imuno-histoquímico p53/p16 observamos uma concordância entre a classificação morfológica (preconizada pela OMS) e a IHQ (algoritmo) em 65,5% das mulheres com CSOBG e em 97,3% das mulheres com CSOAGs, sem levar em consideração a expressão da WT1. Entre os tumores classificados como serosos de baixo grau, dois casos (9,5%) teriam sido classificados como seroso de alto grau, usando apenas o algoritmo imuno-histoquímico p53/p16, e 10 (11,9%) das mulheres morfológicamente classificadas como alto grau teriam sido classificadas como baixo grau pelo algoritmo imuno-histoquímico ($k=0,68$). Em contrapartida, 34,5% das mulheres classificadas como CSOBG pelo algoritmo foram classificadas como alto grau pelas características morfológicas, e 2,6% das mulheres classificadas como CSOAG pelo algoritmo foram classificadas como baixo grau pelas características morfológicas.

A perda da função do *P53* desempenha um papel central no desenvolvimento do câncer, sendo esta a alteração genética mais comum nos cânceres humanos (Lee e cols., 2013). Apesar das alterações do gene *P53* serem frequentemente detectadas nos CSOAGs e estarem associadas com alta proliferação de células tumorais a associação entre a expressão da p53 e o prognóstico permanecem controversos.

O gene *P16* é frequentemente mutado em uma ampla variedade de tumores e é conhecido por ser um importante gene supressor tumoral (Romagosa e cols., 2011; Beirne e cols., 2016). Está bem estabelecido que a p16 contribui para a regulação da progressão do ciclo celular pela inibição da fase S, porém muitos aspectos de sua função e de sua regulação no ciclo celular e consequentemente relação ao prognóstico ainda não estão totalmente esclarecidos (Kurman e cols., 2014). Milea e cols. (2014) num estudo recente observaram que imunoexpressão da proteína p16 esteve relacionada à SLP e SG na análise univariada, embora sem significância estatística na análise multivariada (Milea e cols., 2014; Beirne e cols., 2016). Beirne e cols. (2016) revisaram este artigo e concordaram com os dados apresentados pela autora e sugerem que a avaliação IHQ da p16 deve ser rotineiramente realizada nos COs e demais estudos devem explorar o potencial da p16 como biomarcador de resposta à quimioterapia em carcinomas serosos de alto grau.

Em nosso estudo, observamos que expressão da p53 e p16 (algoritmo imuno-histoquímico p53/p16) estiveram associadas a uma pior SLP, mas não pior SG nas mulheres com carcinoma seroso de ovário.

Enquanto cerca de 80% a 90% dos cânceres de ovário ocorrem de forma esporádica, em 10% a 20% das mulheres existem fatores hereditários predisponentes (componente genético ou familiar). Este risco depende do gene afetado e da mutação específica em cada caso (Permuth-Wey e cols., 2009; Pennington e cols., 2012). A disfunção dos genes *BRCA1/2* ocorre por mutações da linha germinativa, mutações somáticas e metilação do promotor do gene (Permuth-Wey e cols., 2009; Weissman e cols., 2012; Garg e cols., 2013). A maioria dos COs que apresentam inativação do gene *BRCA1* são os CSOAGs (Umar e cols., 2004; Kwon e cols., 2011; Soslow e cols., 2012). A determinação da expressão do *BRCA1* por IHC detecta mulheres com tumores, principalmente, com perda da função de linha germinativa (Thrall e cols., 2006; Hjortkjær e cols., 2017). Não existe na literatura um protocolo definido para avaliação IHQ da *BRCA1*. Em nosso estudo utilizamos o corte de 10% dos núcleos corados como sugerido por alguns autores (Thrall e cols., 2006, Carser e cols., 2011, Meisel e cols., 2014). Em nosso estudo 38.1% e 21.7% das mulheres com carcinoma serosos de baixo e alto grau, respectivamente, apresentaram expressão positiva para o *BRCA1* ($p=0.12$).

A presença de mutações germinativas dos genes *BRCA1/2* nos COs parece estar associada a melhor sobrevida. Embora estes mecanismos não estejam totalmente esclarecidos, isso deve ocorrer pela incapacidade na reparação homóloga das quebras de fita dupla do ADN. Essa deficiência na recombinação homóloga torna as mulheres com mutações

germinativas nos *BRCA1/2* mais sensíveis à quimioterapia à base de platina, e susceptibilidade à inibição da *PARP* em comparação as mulheres cujos tumores não apresentam esta mutação (Umar e cols., 2004; Tan e cols., 2008; Kwon e cols., 2011; Soslow e cols., 2012; Sun e cols., 2014; Gorodnova e cols., 2015; Tan e cols., 2015;).

Na literatura diversos estudos tendem a relacionar a mutação do *BRCA1* a uma melhor sobrevida nas mulheres com carcinoma seroso de ovário, porém esses dados são controversos. Essa associação começou a ser estudada em 1996, quando Rubin e cols., observaram que as mulheres com câncer de ovário com mutações dos *BRCA1/2* tiveram um melhor prognóstico (Rubin e cols., 1996). Mais recentemente, outros autores relacionaram esta expressão da *BRCA* com uma melhor SG (Bolton e cols., 2012; Synowiec e cols., 2016) e outros a uma melhor SLP (Sun e cols., 2014; Zhong e cols., 2015). Outros autores ainda relacionaram a uma melhor resposta à quimioterapia baseada em platina, ou em relação quimioterapia adjuvante (Tan e cols., 2015) ou neoadjuvante (Gorodnova e cols., 2015). Se a resposta superior à quimioterapia à base de platina se traduz em um melhor resultado não está claro. Gallagher e cols. (2011) referem uma melhor SG em mulheres com CO em estádios avançados independente da sensibilidade primária a platina (Gallagher e cols., 2011) ou que apesar de apresentarem uma sensibilidade inicial a platina, isso não se manteve relacionado a uma melhor SG ao longo do tempo (Kotsopoulos e cols., 2016). Nesta mesma linha McLaughlin e cols. (2013) e Candido-dos-Reis e cols. (2015), observaram que a resposta à quimioterapia baseada em platina não interferiu na sobrevida em longo prazo. Parece que, após um diagnóstico de câncer de ovário, a mutação *BRCA* confere um benefício transitório de mortalidade que diminui com o tempo (Biglia e cols., 2016). Outros autores mostraram que, apenas as mutações no *BRCA2* e não do *BRCA1* estiveram associadas a uma melhor sobrevida em mulheres com câncer de ovário (Yang e cols., 2011). Apenas em estudos mais antigos observou-se pior sobrevida em mulheres com mutações nos genes *BRCA1/2* (Jo'annsson e cols., 1998; Pharoah e cols., 1999).

No nosso estudo a expressão da *BRCA1* não esteve relacionada com o estágio ao diagnóstico, doença residual após a cirurgia, resposta à quimioterapia baseada em platina, progressão e/ou recorrência e consequentemente SLP e SG tanto nos carcinomas serosos de baixo como alto grau.

A expressão do antígeno Ki67 tornou-se um marcador amplamente utilizado para determinar o potencial proliferativo de um tumor. Sua expressão está mais presente nas mulheres com carcinoma seroso de alto grau quando comparadas àquelas com o carcinoma de baixo grau, uma vez que o carcinoma de alto grau tem um maior índice mitótico (Lim e cols.,

2013; Kurman e cols., 2016). No nosso estudo observamos que a expressão do Ki67 foi significativamente maior nas mulheres com CSOAG (55,9%) quando comparada com os serosos de baixo grau (9,5%).

A expressão do Ki67 e seu valor prognóstico nos carcinomas serosos do também são controversos. Alguns estudos sugerem que a expressão do Ki67 está associada à pior sobrevida, uma vez que, como são tumores altamente proliferativos estão associados a um pior prognóstico e à doença em estádios avançados (Petrowsky e cols., 2001; Pollack et al, 2004; Kritpracha e cols., 2005; Viale e cols., 2008; Margulis e cols., 2009; Mishra e cols., 2010). No entanto, outros indicam que a expressão elevada do Ki67 esteve associada a uma melhor SLP, uma vez que tumores altamente proliferativos parecem responder melhor à quimioterapia baseada em platina (Khouja e cols., 2007; Liu e cols., 2012; Feng e cols., 2016; Grabowski et al., 2016).

Assim, no nosso estudo avaliamos a correlação entre a imunoexpressão do Ki67 e sua relação com resposta à platina e prognósticos nas mulheres com carcinoma seroso de ovário.

No nosso estudo a expressão da Ki67 não esteve relacionada com o estágio ao diagnóstico, doença residual após a cirurgia, resposta à quimioterapia baseada em platina, progressão e/ou recorrência e consequentemente SLP e SG tanto nos carcinomas serosos de baixo como alto grau.

A β -catenina está envolvida na regulação da expressão dos genes como um mediador na via de sinalização Wnt. A desregulação da degradação de β -catenina aumenta seus níveis no citoplasma sendo ela translocada para o núcleo, onde pode levar à ativação da transcrição de diversos genes. A expressão da β -catenina está predominantemente localizada na membrana e citoplasma das células e raramente do núcleo (Wang e cols., 2014). Em nosso estudo observamos exatamente esta distribuição, onde a expressão da β -catenina ocorreu principalmente no citoplasma (com ou sem membrana) em mais 80% dos carcinomas serosos e apenas um caso de CSOBG expressou esse marcador nos núcleos.

Alguns estudos sugerem que a expressão da β -catenina esteja envolvida na carcinogênese, progressão, metastização e consequentemente pior sobrevida no CO (Lee e cols., 2003; Wang e cols., 2014). Outros estudos sugerem que β -catenina estaria associada à uma pior sobrevida em pacientes com carcinoma seroso de alto grau, devido a uma maior resistência à platina pela ativação da via WNT/ β -catenina, porém estes mecanismos ainda são pouco compreendidos (Su e cols., 2010; Rosanò e cols., 2014). Em nosso estudo ao avaliarmos a imunoexpressão da β -catenina em mulheres com carcinoma seroso de ovário de

baixo e alto grau, observamos que não esteve relacionada com o grau histológico, o estágio no diagnóstico, doença residual, resposta à quimioterapia baseada em platina, progressão e/ou recorrência e consequentemente SLP e SG tanto nos serosos de baixo como alto grau.

O CO é uma doença heterogênea com diferentes respostas ao tratamento e desfechos clínicos. As estatísticas desfavoráveis das pacientes com CO ocorrem por não existir um rastreamento efetivo que reduza a mortalidade e refletem ainda o pouco conhecimento da origem e comportamento desta doença (Huang e cols., 2008; Kurman e cols., 2016).

Os desafios estão não somente no diagnóstico, mas também no tratamento. Desafios na tentativa de personalizar as opções de tratamentos e terapias alvos, incluem uma correta identificação da população a ser tratada, bem como um entendimento claro dos mecanismos subjacentes à resposta e resistência à quimioterapia. É aceito que a análise morfológica e/ou IHQ do tumor no momento do diagnóstico ou na recidiva, seriam suficientes para produzir informações necessárias e direcionar o tratamento. No entanto, o reconhecimento da heterogeneidade dos COs e de suas diferentes respostas, representa um desafio adicional de como interpretar esses resultados na prática clínica. Como observado em nosso estudo com alguns marcadores proteicos imuno-histoquímicos de proliferação e diferenciação celular, e levando em consideração os dados conflitantes da literatura, percebe-se que são necessárias análises complementares com outros marcadores para uma melhor avaliação do perfil molecular destes tumores.

6. CONCLUSÃO

6.1. Não houve diferença significativa na imunexpressão da WT1 comparando os carcinomas serosos de baixo e alto grau. A imunexpressão da p53 e p16 foi significativamente maior nas mulheres com CSOAG. O algoritmo imuno-histoquímico p53/p16 identificou mais de 90% das mulheres com CSOAG. A imunexpressão da WT1, não esteve relacionada a sobrevida. O algoritmo imuno-histoquímico p53/p16 esteve significativamente associada a uma pior SLP, mas não SG, nas mulheres com carcinoma CSOAG apenas na análise univariada.

6.2. Não houve diferença significativa na imunexpressão da BRCA1 e β -catenina entre os carcinomas serosos de ovário. A imunexpressão da Ki67 foi significativamente maior nas mulheres com CSOAG. A imunexpressão da BRCA1, Ki67 e β -catenina não estiveram relacionadas com a resposta à platina ou a sobrevida nas mulheres com carcinoma seroso de ovário.

7. REFERÊNCIAS

1. American Cancer Society: Cancer Facts and Figures 2016. Atlanta, Ga: American Cancer Society, 2016. Disponível em: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/document/acspc-047079.pdf>. Acessado: 09 de março de 2017.
2. Alkema NG, Wisman GB, van der Zee AG, van Vugt MA, de Jong S. Studying platinum sensitivity and resistance in high-grade serous ovarian cancer: Different models for different questions. *Drug Resist Updat*. 2016; 24:55-69.
3. Aune G, Stunes AK, Tingulstad S, Salvesen O, Syversen U, Torp SH. The proliferation markers Ki67/MIB-1, phosphohistone H3, and survivin may contribute in the identification of aggressive ovarian carcinomas. *Int J Clin Exp Pathol*. 2011; 4(5):444-53.
4. Bachmayr-Heyda A, Aust S, Heinze G, Polterauer S, Grimm C, Braicu EI, e cols. Prognostic impact of tumor infiltrating CD8+ T cells in association with cell proliferation in ovarian cancer patients--a study of the OVCAD consortium. *BMC Cancer*. 2013; 13:422.
5. Banet N, Kurman RJ. Two types of ovarian cortical inclusion cysts: proposed origin and possible role in ovarian serous carcinogenesis. *Int J Gynecol Pathol*. 2015; 34(1):3-8.
6. Bankhead CR, Kehoe ST, Austoker J. Symptoms associated with diagnosis of ovarian cancer: a systematic review. *BJOG*. 2005; 112:857-65.
7. Bast RC Jr, Badgwell D, Lu Z, Marquez R, Rosen D, Liu J, e cols. New tumor markers: CA125 and beyond. *Int J Gynecol Cancer*. 2005; 15(3):274-81.
8. Beirne JP, McArt DG, James JA, Salto-Tellez M, Maxwell P, McCluggage WG. p16 as a prognostic indicator in ovarian/tubal high-grade serous carcinoma. *Histopathology*. 2016; 68(4):615-618.
9. Bell DA. Origins and molecular pathology of ovarian cancer. *Mod Pathol*. 2005; 18(2):19-32.
10. Berek JS, Crum C, Friedlander M. Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int J Gynaecol Obstet*. 2015; 131(2):111-22.
11. Berek JS, Friedlander M, Hacker NF. Epithelial ovarian, fallopian tube, and peritoneal cancer. In: Berek JS, Hacker NF, editors. *Berek and Hacker's Gynecologic Oncology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. 2015:464-529.
12. Bhagat R, Premalata CS, Shilpa V, Pallavi VR, Ramesh G, Vijay CR, e cols. Altered expression of beta-catenin, E-cadherin, and E-cadherin promoter methylation in epithelial ovarian carcinoma. *Tumour Biol*. 2013; 34:2459-68.

13. Biglia N, Sgandurra P, Bounous VE, Maggiorotto F, Piva E, Pivetta E, e cols. Ovarian cancer in BRCA1 and BRCA2 gene mutation carriers: analysis of prognostic factors and survival. *Ecancermedalscience*. 2016; 10:639.
14. Bodurka DC, Deavers MT, Tian C, Sun CC, Malpica A, Coleman RL, e cols. Reclassification of serous ovarian carcinoma by a 2-tier system: A Gynecologic Oncology Group Study. *Cancer*. 2012; 118(12):3087-94.
15. Bolton KL, Chenevix-Trench G, Goh C, e cols. Association between BRCA1 and BRCA2 mutations and survival in women with invasive epithelial ovarian cancer. *JAMA*. 2012; 307:382-90.
16. Buys SS, Partridge E, Black A, Johnson CC, Lamerato L, Isaacs C, e cols. Effect of screening on ovarian cancer mortality: The Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial. *JAMA*. 2011; 305(22):2295-303.
17. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*. 2011;474(7353):609-15.
18. Candido-dos-Reis FJ, Song H, Goode EL, e cols. Germline mutation in BRCA1 or BRCA2 and ten-year survival for women diagnosed with epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 2015; 21:652-7.
19. Canevari S, Gariboldi M, Reid JF, Bongarzone I, Pierotti MA. Molecular predictors of response and outcome in ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2006; 60(1):19-37.
20. Carser JE, Quinn JE, Michie CO, O'Brien EJ, McCluggage WG, Maxwell P e cols. BRCA1 is both a prognostic and predictive biomarker of response to chemotherapy in sporadic epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* 2011; 123(3):492-98.
21. Cathro HP, Stoler MH. The utility of calretin inhibin, and WT1 immunohistochemical staining in the differential diagnosis of ovarian tumors. *Hum Pathol*. 2005; 36(2):195-201.
22. Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Galle J, e cols. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol*. 1992; 168(4):357-63.
23. CDC - Centres for Disease Control and Prevention. Module 5: Ovarian Cancer. Disponível em: <http://www.cdc.gov/cancer/knowledge/provider-education/ovarian/risk-factors.htm>. Acessado: 25 de novembro de 2016.
24. Chang SJ, Bristow RE, Ryu HS. Impact of complete cytoreduction leaving no gross residual disease associated with radical cytoreductive surgical procedures on survival in advanced ovarian cancer. *Ann Surg Oncol*. 2012; 19(13):4059-67.

25. Chen M, Yao S, Cao Q, Xia M, Liu J, He M. The prognostic value of Ki67 in ovarian high-grade serous carcinoma: an 11-year cohort study of Chinese patients. *Oncotarget*. 2016^a.
26. Chen S, Cavazza E, Barlier C, Salleron J, Filhine-Tresarrieu P, Gavoilles C. Beside P53 and PTEN: Identification of molecular alterations of the RAS/MAPK and PI3K/AKT signaling pathways in high-grade serous ovarian carcinomas to determine potential novel therapeutic targets. *Oncol Lett*. 2016^b; 12(5):3264-72.
27. Chi DS, Musa F, Dao F, Zivanovic O, Sonoda Y, Leitao MM, e cols. An analysis of patients with bulky advanced stage ovarian, tubal, and peritoneal carcinoma treated with primary debulking surgery (PDS) during an identical time period as the randomized EORTC-NCIC trial of PDS vs neoadjuvant chemotherapy (NACT). *Gynecol Oncol*. 2012; 124(1):10-4.
28. Cho KR, Shih IM. Ovarian cancer. *Annual Review of Pathology*. 2009; 4:287-313.
29. Chou YY, Jeng YM, Kao HL, Chen T, Mao TL, Lin MC. Differentiation of ovarian mucinous carcinoma and metastatic colorectal adenocarcinoma by immunostaining with beta-catenin. *Histopathology*. 2003; 43:151-6.
30. Colombo PE, Fabbro M, Theillet C, Bibeau F, Rouanet P, Ray-Coquard I. Sensitivity and resistance to treatment in the primary management of epithelial ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2014; 89:207-16
31. Coosemans A, Vanderstraeten A, Tuytaerts S, Verschuere T, Moerman P, Berneman Z, e cols. Immunological response after WT1 mRNA-loaded dendritic cell immunotherapy in ovarian carcinoma and carcinosarcoma. *Anticancer Res*. 2013; 33(9):3855-59.
32. Coosemans A, Vergote I, Van Gool SW. Dendritic cell-based immunotherapy in ovarian cancer. *Oncoimmunology*. 2013^a; 2(12):27059.
33. Cox, DR, Oakes D. *Analysis of Survival Data*. Chapman and Hall, London-New York 1984, 201p.
34. Davis A, Tinker AV, Friedlander M. "Platinum resistant" ovarian cancer: what is it, who to treat and how to measure benefit? *Gynecol Oncol*. 2014; 133(3):624-31
35. Davies BR, Worsley SD, Ponder BA. Expression of E-cadherin, alpha-catenin and beta-catenin in normal ovarian surface epithelium and epithelial ovarian cancer. *Histopathology*. 1998; 32:69-80.
36. de Toledo MC. Expressão dos receptores de estrógeno, progesterona, andrógena e HER2 no câncer epitelial de ovário. Mestrado em Tocoginecologia. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas; 2012.
37. de Toledo MC, Sarian LO; Sallum, LF, Andrade LLA, Vassallo J, de Paiva Silva GR, e cols. Analysis of the contribution of immunologically-detectable HER2, steroid receptors and of

- the triple-negative tumor status to disease free and overall survival of women with epithelial ovarian cancer. *Acta Histochemica*. 2013; 13:190-6.
38. Diniz PM, Carvalho JP, Baracat EC, Carvalho FM. Fallopian tube origin of supposed ovarian high-grade serous carcinomas. *Clinics*. 2011; 66(1):73-6.
 39. Faleiro-Rodrigues C, Macedo-Pinto I, Pereira D, Ferreira VM, Lopes CS. Association of E-cadherin and beta-catenin immunoexpression with clinicopathologic features in primary ovarian carcinomas. *Hum Pathol*. 2004; 35:663-9.
 40. Fathalla MF. Incessant ovulation - a fator in ovarian neoplasia? *Lancet*. 1971; 2(7716):163.
 41. Fathalla MF. Incessant ovulation and ovarian cancer - a hypothesis revisited. *Facts Views Vis Obgyn*. 2013; 5(4):292-97.
 42. Feng Z, Wen H, Bi R, Ju X, Chen X, Yang W, e cols. A clinically applicable molecular classification for high-grade serous ovarian cancer based on hormone receptor expression. *Sci Rep*. 2016; 6:25408.
 43. Ferreira PA, Sallum LF, Sarian LO, Andrade LA, Derchain S. Serous and non-serous ovarian carcinoma: histological tumor type as related to the grade of differentiation and disease prognosis. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2012; 34(5):196-202.
 44. Fujimoto J, Ichigo S, Hirose R, Sakaguchi H, Tamaya T. Expression of E-cadherin and alpha and beta-catenin mRNAs in ovarian cancers. *Cancer Lett* 1997; 115:207-12.
 45. Gallagher DJ, Konner JA, Bell-McGuinn KM, e cols. Survival in epithelial ovarian cancer: a multivariate analysis incorporating BRCA mutation status and platinum sensitivity. *Ann Oncol*. 2011; 22:1127-32.
 46. Garg K, Levine DA, Olvera N, Dao F, Bisogna M, Secord AA, e cols. BRCA 1 immunohistochemistry in a molecular characterized cohort of ovarian high-grade serous carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2013; 37(1):138-46.
 47. Gill SE, McGree ME, Weaver AL, Cliby WA, Langstraat CL. Optimizing the treatment of ovarian cancer: Neoadjuvant chemotherapy and interval debulking versus primary debulking surgery for epithelial ovarian cancers likely to have suboptimal resection. *Gynecol Oncol*. 2017; 144(2):266-273.
 48. GLOBOCAN 2012: estimated cancer incidencie, mortality and prevalence worldwide in 2012. Disponivel em: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx. Acessado: 09 de março de 2017.
 49. Goldstein NS, Bassi D, Uzieblo A. WT1 is an integral component of an antibody panel to distinguish pancreaticobiliary and some ovarian epithelial neoplasms. *Am J Clin Pathol*. 2001; 116(2):246-52.

50. Gorodnova TV, Sokolenko AP, Ivantsov AO, e cols. High response rates to neoadjuvant platinum-based therapy in ovarian cancer patients carrying germ-line BRCA mutation. *Cancer Lett.* 2015; 369:363-7.
51. Grabowski JP, Harter P, Heitz F, Pujade-Lauraine E, Reuss A, Kristensen G, e cols. Operability and chemotherapy responsiveness in advanced low-grade serous ovarian cancer. An analysis of the AGO Study Group metadatabase. *Gynecol Oncol.* 2016; 140(3):457-62.
52. Hara E, Smith R, Parry D, Tahara H, Stone S, Peters G. Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol. Cell. Biol.* 1996; 16(3):859-67.
53. He H, Luthringer DJ, Hui P, Lau SK, Weiss LM, Chu PG. Expression of CD56 and WT1 in ovarian stroma and ovarian stromal tumors *Am. J. Surg. Pathol.* 2008; 32(6):884-90.
54. Hjortkjær M, Waldstrøm M, Jakobsen A, Kanstrup H, Søgård-Andersen E, Dahl Steffensen K. The Prognostic Value of BRCA1 and PARP Expression in Epithelial Ovarian Carcinoma: Immunohistochemical Detection. *Int J Gynecol Pathol.* 2017; 36(2):180-9.
55. Høgdaal EV, Christensen L, Kjaer SK, Blaakaer J, Christensen IJ, Gayther S, e cols. Expression level of Wilms tumor 1 (WT1) protein has limited prognostic value in epithelial ovarian cancer: from the Danish "MALOVA" ovarian cancer study. *Gynecol Oncol.* 2007; 106(2):318-24.
56. Howitt BE, Hanamornroongruang S, Lin DI, Conner JE, Schulte S, Horowitz N, e cols. Evidence for a dualistic model of high-grade serous carcinoma: BRCA mutation status, histology, and tubal intraepithelial carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2015; 39:287-93.
57. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Altekruse SF, e cols. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013. Bethesda, Md: National Cancer Institute, 2016. Disponível em: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/. Acessado: 30 de janeiro de 2017.
58. Huang L, Cronin KA, Johnson KA, Mariotto AB, Feuer EJ. Improved survival time: what can survival cure models tell us about population-based survival improvements in late-stage colorectal, ovarian, and testicular cancer? *Cancer.* 2008; 112(10):2289-300.
59. Hunn J, Rodriguez GC. Ovarian cancer: etiology, risk factors, and epidemiology. *Clin Obstet Gynecol.* 2012; 55(1):3-23.
60. INCA - Instituto Nacional do Cancer, Coordenação Nacional de Prevenção e Vigilância do Câncer. Câncer no Brasil - Dados dos Registros de Base Populacional. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/ovario>. Acesso em: Acessado: 30 de janeiro de 2017.

61. INCA - Instituto Nacional do Cancer, Ministerio da Saúde. Rio de Janeiro, Brasil. Estimativa 2014. Incidência de câncer no Brasil. Disponível em:
http://www.saude.sp.gov.br/resources/ses/perfil/gestor/homepage/outros-destaques/estimativa-de-incidencia-de-cancer-2014/estimativa_cancer_24042014.pdf.
 Acessado: 20 de novembro de 2016.
62. Jacobs IJ, Menon U, Ryan A, Gentry-Maharaj A, Burnell M, e cols. Ovarian cancer screening and mortality in the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2016; 387(10022):945-56.
63. Joánnsson OT, Ránstam J, Borg A, e cols. Survival of BRCA1 breast and ovarian cancer patients: a population-based study from southern Sweden. *J Clin Oncol*. 1998; 16:397-404.
64. Ju GZ, Wang XM, Fu SB, Liu SZ. Effect of ionizing radiation on the expression of p16, cyclinD1 and CDK4 in mouse thymocytes and splenocytes. *Biomed Environ Sci*. 2003; 16:47-52.
65. Kalloger SE, Köbel M, Leung S, Mehl E, Gao D, Marcon KM, e cols. Calculator for ovarian carcinoma subtype prediction. *Mod Pathol* 2011; 24(4):512-521.
66. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *Journal of the American Statistical Association*. 1958; 53(282):457-81.
67. Kato Y. Efficacy of WT1 peptide-/MUC-1 peptide-pulsed dendritic cell therapy in 313 patients with a wide range of cancers. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2014;41(10):1280-82.
68. Keilholz U, Letsch A, Busse A, Asemisen AM, Bauer S, Blau IW, e cols. A clinical and immunologic phase 2 trial of Wilms tumor gene product 1 (WT1) peptide vaccination in patients with AML and MDS. *Blood*. 2009; 113(26):6541-8.
69. Khouja MH, Baekelandt M, Nesland JM, Holm R. The clinical importance of Ki67, p16, p14, and p57 expression in patients with advanced ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Pathol*. 2007; 26(4):418-25.
70. Kindelberger DW, Lee Y, Miron A, Hirsch MS, Feltmate C, Medeiros F, e cols. Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pelvic serous carcinoma: Evidence for a causal relationship. *Am J Surg Pathol*. 2007; 31(2):161-9.
71. Köbel M, Bak J, Bertelsen BI, Carpen O, Grove A, Hansen ES, e cols. Ovarian carcinoma histotype determination is highly reproducible, and is improved through the use of immunohistochemistry. *Histopathology*. 2014; 64(7):1004-13.
72. Köbel M, Kalloger SE, Boyd N, McKinney S, Mehl E, Palmer C, e cols. Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: implications for biomarker studies. *PLoS Med*. 2008; 5(12):232.

73. Köbel M, Reuss A, du Bois A, Kommoss S, Kommoss F, Gao D, e cols. The biological and clinical value of p53 expression in pelvic high-grade serous carcinomas. *J Pathol.* 2010; 222:191-8.
74. Koesters R, Linnebacher M, Coy JF, Germann A, Schwitalle Y, Findeisen P, e cols. WT1 is a tumor-associated antigen in colon cancer that can be recognized by in vitro stimulated cytotoxic T cells. *Int. J. Cancer.* 2004; 109:385-92.
75. Koshiyama M, Matsumura N, Konishi I. Recent concepts of ovarian carcinogenesis: type I and type II. *Biomed Res Int.* 2014:934261.
76. Kotsopoulos J, Rosen B, Fan I, Moody J, McLaughlin JR, Risch H, e cols. Ten-year survival after epithelial ovarian cancer is not associated with BRCA mutation status. *Gynecol Oncol.* 2016; 140:42-7.
77. Kritpracha K, Hanprasertpong J, Chandeying V, Dechsukhum C, Geater A. Survival analysis in advanced epithelial ovarian carcinoma in relation to proliferative index of MIB-1 immunostaining. *J Obstet Gynaecol Res.* 2005; 31(3):268-76.
78. Kurman RJ, Shih Iem. Pathogenesis of ovarian cancer: lessons from morphology and molecular biology and their implicarions. *Int J Gynecol Pathol.* 2008; 27(2):151-60.
79. Kurman RJ, Shih IeM. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *Am J Surg Pathol.* 2010; 34(3):433-43.
80. Kurman RJ, Shih IeM. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian câncer - shifting the paradigm. *Hum Pathol.* 2011; 42(7):918-31.
81. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington S, Young RH. WHO classification of tumours of female reproductive organs. ed 4. Lyon, France, IARC, 2014.
82. Kurman RJ, Shih IeM. The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded. *Am J Pathol.* 2016; 186(4):733-47.
83. Kwon JS, Scott JL, Gilks CB, Daniels MS, Sun CC, Lu KH. Testing women with endometrial cancer to detect Lynch syndrome. *J Clin Oncol.* 2011; 29:2247-52.
84. Ladomery M, Sommerville J, Woolner S, Slight J, Hastie N. Expression in *Xenopus* oocytes shows that WT1 binds transcripts in vivo, with a central role for zinc finger one, *J. Cell Sci.* 2003; 116:1539-49.
85. Lancaster JM, Powell CB, Chen LM, Richardson DL. SGO Clinical Practice Committee. Society of Gynecologic Oncology statement on risk assessment for inherited gynecologic cancer predispositions. *Gynecol Oncol.* 2015; 136(1):3-7.
86. Lataifeh I, Marsden DE, Robertson G, Gebiski V, Hacker NF. Presenting symptoms of epithelial ovarian cancer. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2005; 45:211-14.

87. Lee CM, Shvartsman H, Deavers MT, Wang SC, Xia W, Schmandt R, e cols. beta-catenin nuclear localization is associated with grade in ovarian serous carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2003; 88(3):363-8.
88. Lee S, Piskorz AM, Le Page C, Mes Masson AM, Provencher D, Huntsman D, e cols. Calibration and Optimization of p53, WT1, and Napsin A Immunohistochemistry Ancillary Tests for Histotyping of Ovarian Carcinoma: Canadian Immunohistochemistry Quality Control (CIQC) Experience. *Int J Gynecol Pathol.* 2016; 35(3):209-21.
89. Lee SH, Kim H, Kim WY, Han HS, Lim SD, Kim WS, e cols. Genetic alteration and immunohistochemical staining patterns of ovarian high-grade serous adenocarcinoma with special emphasis on p53 immnnostaining pattern. *Pathol Int.* 2013; 63(5):252-9.
90. Lim D, Oliva E. Precursors and pathogenesis of ovarian carcinoma. *Pathology.* 2013; 45(3):229-42.
91. Linden MD, Torres FX, Kubus J, Zarbo RJ. Clinical application of morphologic and immunocytochemical assessments of cell proliferation. *Am J Clin Pathol.* 1992; 97(5):4-13.
92. Liu P, Sun YL, Du J, Hou XS, Meng H. CD105/Ki67 coexpression correlates with tumor progression and poor prognosis in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2012; 22(4):586-92.
93. Liu Z, Yamanouchi K, Ohtao T, Matsumura S, Seino M, Shridhar V, e cols. High levels of Wilms' tumor 1 (WT1) expression were associated with aggressive clinical features in ovarian cancer. *Anticancer Res.* 2014; 34(5):2331-40.
94. Loeb DM, Evron E, Patel CB, Sharma PM, Niranjana B, Buluwela L, e cols. Wilms' tumor suppressor gene (WT1) is expressed in primary breast tumors despite tumor-specific promoter methylation. *Cancer Res.* 2001; 61:921-5.
95. Margulis V, Lotan Y, Karakiewicz PI, Fradet Y, Ashfaq R, Capitanio U, e cols. Multi-institutional validation of the predictive value of Ki67 labeling index in patients with urinary bladder cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009; 21;101(2):114-9.
96. Markauskas A, Mogensen O, dePont Christensen R, Jensen PT. Primary surgery or interval debulking for advanced epithelial ovarian cancer: does it matter? *Int J Gynecol Cancer.* 2014; 24(8):1420-8.
97. McLaughlin JR, Rosen B, Moody J. Long-term ovarian cancer survival associated with mutation in BRCA1 or BRCA2. *J Natl Cancer Inst.* 2013; 105:141-8.
98. Menon U, Skates SJ, Lewis S, Rosenthal AN, Rufford B, Sibley K, e cols. Prospective study using the risk of ovarian cancer algorithm to screen for ovarian cancer. *J Clin Oncol.* 2005; 23(31):7919-26.

99. Milea A, George SH, Matevski D, Jiang H, Madunic M, Berman HK, e cols. Retinoblastoma pathway deregulatory mechanisms determine clinical outcome in high-grade serous ovarian carcinoma. *Mod Pathol*. 2014; 27(7):991-1001
100. Mishra SK, Crasta JA. An immunohistochemical comparison of P53 and Bcl-2 as apoptotic and MIB1 as proliferative markers in low-grade and high-grade ovarian serous carcinomas. *Int J Gynecol Cancer*. 2010; 20(4):537-41.
101. Moore LE, Pfeiffer RM, Zhang Z, Lu KH, Fung ET, Bast RC Jr. Proteomic biomarkers in combination with CA 125 for detection of epithelial ovarian cancer using prediagnostic serum samples from the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial. *Cancer*. 2012; 118(1):91-100.
102. Mutch DG, Prat J. 2014 FIGO staging for ovarian, fallopian tube and peritoneal cancer. *Gynecol Oncol*. 2014; 133(3):401-14.
103. Nagaraj AB, Joseph P, Kovalenko O, Singh S, Armstrong A, Redline R, e cols. Critical role of Wnt/ β -catenin signaling in driving epithelial ovarian cancer platinum resistance. *Oncotarget*. 2015; 6(27):23720-34.
104. Nagle CM, Francis JE, Nelson AE, Zorbas H, Luxford K, de Fazio A, e cols. Reducing time to diagnosis does not improve outcomes for women with symptomatic ovarian cancer: a report from the Australian Ovarian Cancer Study Group. *J Clin Oncol*. 2011; 29:2253-58.
105. Negri E, Franceschi S, Tzonou A, Booth M, La Vecchia C, Parazzini F, e cols. Pooled analysis of 3 European case-control studies of epithelial ovarian cancer: I. Reproductive factors and risk of epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer*. 1991; 49(1):50-6.
106. Netinatsunthorn W, Hanprasertpong J, Dechsukhum C, Leetanaporn R, Geater A. WT1 gene expression as a prognostic marker in advanced serous epithelial ovarian carcinoma: an immunohistochemical study. *BMC Cancer*. 2006; 6:90.
107. Nik NN, Vang R, Shih IeM, Kurman RJ. Origin and pathogenesis of pelvic (ovarian, tubal, and primary peritoneal) serous carcinoma. *Annu Rev Pathol*. 2014; 9:27-45.
108. Nik SA, Hohenstein P, Jadidizadeh A, Van Dam K, Bastidas A, Berry RL, e cols. Upregulation of Wilms' tumor gene 1 (WT1) in desmoid tumors. *Int. J. Cancer*. 2005; 114:202-08.
109. O'Neill CJ, McBride HA, Connolly LE, Deavers MT, Malpica A, McCluggage WG. High-grade ovarian serous carcinoma exhibits significantly higher p16 expression than low-grade serous carcinoma and serous borderline tumour. *Histopathology*. 2007; 50:773-79.

110. Patch AM, Christie EL, Etemadmoghadam D, Garsed DW, George J, Fereday S, e cols. Whole-genome characterization of chemoresistant ovarian cancer. *Nature*. 2015; 521:489-94.
111. Pei XH, Xiong Y. Biochemical and cellular mechanisms of mammalian CDK inhibitors: a few unresolved issues. *Oncogene*. 2005; 24:2787-95.
112. Pennington KP, Swisher EM. Hereditary ovarian cancer: beyond the usual suspects. *Gynecol Oncol*. 2012; 124(2):347-53.
113. Permuth-Wey J, Sellers TA. Epidemiology of ovarian cancer. *Methods Mol Biol*. 2009; 472:413-37.
114. Petrowsky H, Sturm I, Graubitz O, Kooby DA, Staib-Sebler E, Gog C, e cols. Relevance of Ki67 antigen expression and K-ras mutation in colorectal liver metastases. *Eur J Surg Oncol*. 2001; 27(1):80-7.
115. Pharoah PD, Easton DF, Stockton DL, e cols. Survival in familial, BRCA1-associated, and BRCA2- associated epithelial ovarian cancer United Kingdom coordinating committee for cancer res (UKCCCR) familial ovarian cancer study group. *Cancer Res*. 1999; 59:868-71.
116. Piek JM, Verheijen RH, Kenemans P, Massuger LF, Bulten H, van Diest PJ. BRCA1/2-related ovarian cancers are of tubal origin: a hypothesis. *Gynecol Oncol*. 2003; 90(2):491.
117. Piver MS, Barlow, JJ, Lele SB, e cols. Incidence of subclinical metastasis in stage I and II ovarian carcinoma. *Obstet Gynecol*. 1978; 52:100–104.
118. Piver MS, Goldberg JM, Tsukada Y, Mettlin CJ, Jishi MF, Natarajan N. Characteristics of familial ovarian cancer: a report of the first 1,000 families in the Gilda Radner Familial Ovarian Cancer Registry. *Eur J Gynaecol Oncol*. 1996; 17(3):169-76.
119. Pollack A, DeSilvio M, Khor LY, Li R, Al-Saleem TI, Hammond ME, e cols. Ki67 staining is a strong predictor of distant metastasis and mortality for men with prostate cancer treated with radiotherapy plus androgen deprivation: Radiation Therapy Oncology Group Trial 92-02. *J Clin Oncol*. 2004; 22(11):2133-40.
120. Pritchard-Jones K, Fleming S, Davidson D, Bickmore W, Porteous D, Gosden C, e cols. The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. *Nature*. 1990; 346:194-7.
121. Przybycin CG, Kurman RJ, Ronnett BM, Shih IeM, Vang R. Are all pelvic (nonuterine) serous carcinomas of tubal origin? *Am J Surg Pathol*. 2010; 34:1407-16.

122. R Core Team, R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2014. Disponível em: <http://www.R-project.org/>. Acessado: 25 de novembro de 2016.
123. Rayess H, Wang MB, Srivatsan ES. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *Int. J. Cancer*. 2012; 130(8):1715-25.
124. Read CJ, Riva JJ, Busse JW, Goldsmith CH, Elit L. Risks and benefits of screening asymptomatic women for ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gynecol Oncol*. 2013; 130(3):674-81.
125. Resnick K, Straughn JM Jr, Backes F, Hampel H, Matthews KS, Cohn DE. Lynch syndrome screening strategies among newly diagnosed endometrial cancer patients. *Obstet Gynecol*. 2009; 114:530-6.
126. Ricciardelli C, Oehler MK. Diverse molecular pathways in ovarian cancer and their clinical significance. *Maturitas*. 2009; 62(3):270-5.
127. Roh MH, Yassin Y, Miron A, Mehra KK, Mehrad M, Monte NM, e cols. High-grade fimbrial-ovarian carcinomas are unified by altered p53, PTEN and PAX2 expression. *Mod Pathol* 2010; 23(10):1316-24.
128. Romagosa C, Simonetti S, Lopez-Vicente L, Mazo A, Lleonart ME, Castellvi J, e cols. p16(Ink4a) overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene*. 2011; 30:2087-97.
129. Rosanò L, Cianfrocca R, Tocci P, Spinella F, Di Castro V, Caprara V, e cols. A receptor/ β -arrestin signaling to the Wnt pathway renders ovarian cancer cells resistant to chemotherapy. *Cancer Res*. 2014; 74:7453-64.
130. Rosen DG, Huang X, Deavers MT, Malpica A, Silva EG, Liu J. Validation of tissue microarray technology in ovarian carcinoma. *Mod Pathol*. 2004; 17(7):790-7.
131. Rubin SC, Benjamin I, Behbakht K, Takahashi H, Morgan MA, e cols. Clinical and pathological features of ovarian cancer in women with germ- line mutations of BRCA1. *New England Journal of Medicine*. 1996; 335:1413-16.
132. Rustin GJ, Vergote I, Eisenhauer E, Pujade-Lauraine E, Quinn M, Thigpen T, e cols. Definitions for response and progression in ovarian cancer clinical trials incorporating RECIST 1.1 and CA 125 agreed by the Gynecological Cancer Intergroup (GCIG). *Int J Gynecol Cancer*. 2011; 21(2):419-23.
133. Salani R, Kurman RJ, Giuntoli R 2nd, Gardner G, Bristow R, Wang TL, e cols. Assessment of TP53 mutation using purified tissue samples of ovarian serous carcinomas

- reveals a higher mutation rate than previously reported and does not correlate with drug resistance. *International Journal of Gynecological Cancer*. 2008; 18(3):487-91.
134. Sallum, LF. Expressão e valor prognóstico dos receptores de estrógeno e progesterona nos tumores *borderline* e carcinomas de ovário. Mestrado em Tocoginecologia. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas; 2011.
 135. Sallum LF, Sarian LO, Lucci De Angelo Andrade L, Vassallo J, Soares FA, Pinto GA, e cols. Survival of women with ovarian carcinomas and borderline tumors is not affected by estrogen and progesterone receptor status. *J Gynecol Oncol*. 2013; 24(2):167-76.
 136. Scharnhorst V, van der Eb AJ, Jochemsen AG. WT1 proteins: functions in growth and differentiation. *Gene*. 2001; 273:141-61.
 137. Schmeler KM, Tao X, Frumovitz M, Deavers MT, Sun CC, Sood AK, e cols. Prevalence of lymph node metastasis in primary mucinous carcinoma of the ovary. *Obstet Gynecol*. 2010; 116:269-73.
 138. Scholzen T, Gerdes J. The Ki67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000; 182(3):311-22.
 139. Schorge JO, Miller YB, Qi LJ, Muto MG, Welch WR, Berkowitz RS, e cols. Genetic alterations of the WT1 gene in papillary serous carcinoma of the peritoneum. *Gynecol Oncol*. 2000; 76(3):369-72.
 140. Scully RE, Young RH, Clements PB. Tumors of the ovary, maldeveloped gonads, fallopian tube, and broad ligaments. *Atlas of Tumor Pathology. Third series*. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology. 1998.
 141. Serrano M. The tumor suppressor protein p16INK4a. *Exp Cell Res*. 1997; 237:7-13.
 142. Shimizu Y, Kamoi S, Amada S, Hasumi K, Akiyama F, Silverberg SG. Toward the development of a universal grading system for ovarian epithelial carcinoma. I. Prognostic significance of histopathologic features--problems involved in the architectural grading system. *Gynecol Oncol*. 1998; 70(1):2-12.
 143. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin*. 2011; 61(4):212-36.
 144. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics 2012. *CA: Cancer J. Clin*. 2012; 62:10-29.
 145. Sieh W, Köbel M, Longacre TA, Bowtell DD, deFazio A, Goodman MT, e cols. Hormone-receptor expression and ovarian cancer survival: An Ovarian Tumor Tissue Analysis consortium study. *Lancet Oncol*. 2013; 14(9):853-62.

146. Sölétormos G, Duffy MJ, Othman Abu Hassan S, Verheijen RH, Tholander B, e cols. Clinical Use of Cancer Biomarkers in Epithelial Ovarian Cancer: Updated Guidelines from the European Group on Tumor Markers. *Int J Gynecol Cancer*. 2016; 26(1):43-51.
147. Soslow RA. Histologic subtypes of ovarian carcinoma: an overview. *Int J Gynecol Pathol*. 2008; 27(2):161-74.
148. Soslow RA, Han G, Park KJ, Garg K, Oldera N, Spriggs DR, e cols. Morphologic patterns associated with BRCA1 and BRCA2 genotype in ovarian carcinoma. *Mod Pathol*. 2012; 25(4):625-36.
149. Su HY, Lai HC, Lin YW, Liu CY, Chen CK, Chou YC, e cols. Epigenetic silencing of SFRP5 is related to malignant phenotype and chemoresistance of ovarian cancer through Wnt signaling pathway. *Int J Cancer*. 2010; 127:555-67.
150. Sun C, Li N, Ding D, Weng D, Meng L, Chen G, e cols. The role of BRCA status on the prognosis of patients with epithelial ovarian cancer: a systematic review of the literature with a meta-analysis. *PLoS One*. 2014; 9(5):e95285.
151. Synowiec A, Wcisło G, Bodnar L, Górski B, Szenajch J, Szarlej-Wcisło K, e cols. Clinical features and outcomes of germline mutation BRCA1-linked versus sporadic ovarian cancer patients. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*. 2016; (14):1.
152. Takahashi H, Okamoto M, Shimodaira S, Tsujitani S, Nagaya M, Ishidao T, e cols. Impact of dendritic cell vaccines pulsed with Wilms' tumour-1 peptide antigen on the survival of patients with advanced non-small cell lung cancers. *Eur J Cancer*. 2013; 49(4):852-59.
153. Tan DS, Rothermundt C, Thomas K, Bancroft E, Eeles R, Shanley S, e cols. "BRCAness" syndrome in ovarian cancer: a case-control study describing the clinical features and outcome of patients with epithelial ovarian cancer associated with BRCA1 and BRCA2 mutations. *J Clin Oncol*. 2008; 26:5530-6.
154. Tan DS, Kaye SB. Chemotherapy for patients with BRCA1 and BRCA2-mutated ovarian cancer: same or different? *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2015:114-21.
155. Taube ET, Denkert C, Sehouli J, Kunze CA, Dietel Braicu I, Letsch A, e cols. Wilms tumor protein 1 (WT1) - not only a diagnostic but also a prognostic marker in high-grade serous ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2016; 140(3):494-502.
156. Trimbos JB. Surgical treatment of early-stage ovarian cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2017; 41:60-70.
157. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, e cols. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst*. 2004; 96:261-68.

158. USPSTF - U.S. Preventive Services Task Force. Screening for ovarian cancer: reaffirmation recommendation statement. *Am Fam Physician*. 2015;87(10). Disponível em: www.aafp.org/afp/2013/0515/od1.pdf. Acessado: 26 de novembro de 2016.
159. Viale G, Giobbie-Hurder A, Regan MM, Coates AS, Mastropasqua MG, Dell'Orto P, e cols. Prognostic and predictive value of centrally reviewed Ki67 labeling index in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: results from Breast International Group Trial 1-98 comparing adjuvant tamoxifen with letrozole. *J Clin Oncol*. 2008; 26(34):5569-75
160. Wang H, Wang H, Makki MS, Wen J, Dai Y, Shi Q, e cols. Overexpression of β -catenin and cyclinD1 predicts a poor prognosis in ovarian serous carcinomas. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013; 7(1):264-71.
161. Weissman SM, Weiss SM, Newlin AC. Genetic Testing by Cancer Site. *Ovary Cancer Journal*. 2012; 18(4):320-27.
162. Wright AA, Bohlke K, Armstrong DK, Bookman MA, Cliby WA, Coleman RL, e cols. Neoadjuvant chemotherapy for newly diagnosed, advanced ovarian cancer: Society of Gynecologic Oncology and American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *Gynecol. Oncol*. 2016; 143:3-15.
163. Xu JL, Commins J, Partridge E, Riley TL, Prorok PC, Johnson CC, e cols. Longitudinal evaluation of CA-125 velocity and prediction of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2012; 125(1):70-4.
164. Yamaguchi K, Huang Z, Matsumura N, Mandai M, Okamoto T, Baba T, e cols. Epigenetic determinants of ovarian clear cell carcinoma biology. *Int J Cancer*. 2014; 135:585-97.
165. Yang D, Khan S, Sun Y, Hess K, Shmulevich I, Sood AK, e cols. Association of BRCA1 and BRCA2 mutations with survival, chemotherapy sensitivity, and gene mutator phenotype in patients with ovarian cancer. *JAMA*. 2011; 306:1557-65.
166. Zhong Q, Peng HL, Zhao X, Hwang WT. Effects of BRCA1- and BRCA2- related mutations on ovarian and breast cancer survival: a meta-analysis. *Clin Cancer Res*. 2015; 21:211-20.

8. ANEXOS

Anexo 1 - Elsevier License Terms and Conditions

RightsLink Printable License

09/05/17 19:47

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

May 09, 2017

This Agreement between Luis Felipe Sallum ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4102120462643
License date	
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	The American Journal of Pathology
Licensed Content Title	The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis Revisited, Revised, and Expanded
Licensed Content Author	Robert J. Kurman,Ie-Ming Shih
Licensed Content Date	April 2016
Licensed Content Volume	186
Licensed Content Issue	4
Licensed Content Pages	15
Start Page	733
End Page	747
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Intended publisher of new work	other
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	portuguese
Order reference number	
Original figure numbers	Table 1
Title of your thesis/dissertation	Imnnoexpression of protein markers of cell differentiation and proliferation in women with low- and high-grade serous ovarian carcinoma
Expected completion date	Jul 2017
Estimated size (number of pages)	50

Anexo 2 - Parecer CEP



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 24/11/09.
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 1086/2009 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0826.0.146.000-09

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DA P53, KI67, WT1, B-CATENINA E RECEPTORES HORMONAIS EM RELAÇÃO AOS ASPECTOS MORFOLÓGICOS E CLÍNICOS DOS TUMORES EPITELIAIS BORDERLINE E INVASIVOS DE OVÁRIO”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Luis Felipe Trincas Assad Sallum

INSTITUIÇÃO: CAISM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 10/11/2009

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 24/11/10 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Avaliar a expressão dos marcadores moleculares imunoistoquímicos da p53, Ki67, WT1, β catenina e receptores hormonais nos diferentes tipos histológicos de tumores epiteliais borderlines e invasivos primários de ovário, segundo o estágio e grau de diferenciação e sua associação com tempo livre de doença e sobrevida.

III - SUMÁRIO

Este é um estudo observacional de coorte retrospectiva. Serão incluídos os blocos de parafina de 200 mulheres com tumores epiteliais malignos e borderlines primários de ovário, selecionados através dos prontuários no período de 1993 a 2008 no Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil, que não tenham sido submetidas a quimioterapia e/ou radioterapia neoadjuvantes. A avaliação da expressão da p53, WT1, β catenina e receptores de estrogênio e progesterona será realizada por imunohistoquímica após construção de microarranjo dos tecidos (TMA) comparando estes resultados segundo o estágio e grau de diferenciação da doença e sua associação com tempo livre de doença e sobrevida.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Trata-se de projeto de validação de teste de diagnóstico realizado em blocos de parafina de tumores epiteliais malignos de ovário. Trata-se então de projeto retrospectivo bem desenhado do ponto de vista metodológico e com objetivos bem definidos. Cálculo do tamanho amostral adequado e análise estatística bem definida. Os aspectos éticos estão bem discutidos no corpo do projeto e solicita dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por se tratar de material já coletado. O orçamento está muito bem justificado.



V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, a dispensa do Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, bem como todos os anexos incluídos na pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII – DATA DA REUNIÃO

Homologado na XI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 24 de novembro de 2009.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
 VICE-PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
 FCM / UNICAMP



UNICAMP

CEPUNICAMP
comitê de ética em pesquisaPRP
pró-reitoria de pesquisa
unicamp

CEP, 28/03/17.
(PARECER CEP: N° 1086/2009)

PARECER

I – IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DA P53, KI67, WT1, B-CATENINA E RECEPTORES HORMONAIS EM RELAÇÃO AOS ASPECTOS MORFOLÓGICOS E CLÍNICOS DOS TUMORES EPITELIAIS BORDERLINE E INVASIVOS DE OVÁRIO”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Luis Felipe Trincas Assad Sallum

II – PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) aprovou o Relatório Parcial, apresentado em março de 2017 com previsão de conclusão para 30/07/2018, do protocolo de pesquisa supracitado.

III – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na II Reunião Ordinária do CEP/UNICAMP, em 28 de março de 2017.

Dra. Renata Maria dos Santos Celeghini
COORDENADORA DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNICAMP



CEP, 28/03/17.
(PARECER CEP: N° 1086/2009)

PARECER

I – IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DA P53, KI67, WT1, B-CATENINA E RECEPTORES HORMONAIS EM RELAÇÃO AOS ASPECTOS MORFOLÓGICOS E CLÍNICOS DOS TUMORES EPITELIAIS BORDERLINE E INVASIVOS DE OVÁRIO”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Luis Felipe Trincas Assad Sallum

II – PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) aprovou a emenda que inclui a análise da coloração de hematoxilina e eosina e os marcadores P16 e BRCA1, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

III – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na II Reunião Ordinária do CEP/UNICAMP, em 28 de março de 2017.


Dra. Renata Maria dos Santos Celeghini
COORDENADORA DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNICAMP

Anexo 3 - Ficha de coleta de dados

Ficha coleta de dados
Carcinoma de ovário

FICHA N° _____

Identificação: _____

Data recidiva ou progressão:

Número do prontuário: _____

____/____/____

Data de nascimento:

____/____/____

Quimioterapia com platina na recidiva:

1- ☐ Sim2- ☐ Não

CA 125 PREVIO: _____

Resposta a quimioterapia com platina na recidiva:

1- ☐ Sim2- ☐ Não

Data da cirurgia ou biópsia:

____/____/____

Situação:

1- ☐ Vivo2- ☐ Morto

Número bloco:

Core Biopsia _____

Data do óbito: ____/____/____

LE ovário _____

Data ultima consulta

LE omento e anexos _____

____/____/____

Cirurgia ou Biópsia:

Relacionado à doença:

1- ☐ SÓ BIÓPSIA1- ☐ Sim2- ☐ Não2- ☐ R2 tumor residual > 1cm subotima

Perda de follow up:

3- ☐ R1 tumor residual < 1cm ótima1- ☐ Sim2- ☐ Não4- ☐ R0 sem doença residual

Estadio:

Classificação:

1- ☐ I2- ☐ II3- ☐ III1- ☐ Refratário progressão de doença durante tratamento primário ou em até 1 mês do final do tratamento primário (ca 125 persistentemente aumentado ou progressão clínica)

Data Inicio da quimioterapia:

2- ☐ Primariamente resistente progressão de doença em aproximadamente 6 meses apartir do final do tratamento primário e que não responderam a linhas subsequentes de tratamento.

____/____/____

Cirurgia 2nd look:

3- ☐ Primariamente sensível sem progressão de doença em aproximadamente 6 meses apartir do final do tratamento primário ou que apresentaram normalização ou 50% de diminuição no CA 125 a múltiplas linhas de tratamento.1- ☐ Sim2- ☐ Não

Data do 2nd look:

____/____/____

Número 2nd look _____

Data termino da quimioterapia:

____/____/____

Número de ciclos _____

Recidiva ou Progressão:

1- ☐ Sim2- ☐ Não4- ☐ Resistência Adquirida pacientes que falharam em responder a quimioterapia baseada em platina na recidiva tendo previamente apresentado sensibilidade a linhas anteriores.

Sensibilidade inicial: pacientes com doença residual macroscópica após cirurgia que não progrediram após 6 meses do final do tratamento primário e/ou tiveram uma resposta completa ou 50% de resposta na segunda linha e em linhas subsequentes antes do desenvolvimento de resistência

Anexo 4 - John Wiley and Sons License Terms and Conditions

RightsLink Printable License

09/05/17 19:49

JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

May 09, 2017

This Agreement between Luis Felipe Sallum ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	4102110246394
License date	
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Histopathology
Licensed Content Title	Ovarian carcinoma histotype determination is highly reproducible, and is improved through the use of immunohistochemistry
Licensed Content Author	Martin Köbel, Julia Bak, Björn I Bertelsen, Olli Carpen, Anni Grove, Estrid S Hansen, Anne-Marie Levin Jakobsen, Marianne Lidang, Anna Måsbäck, Anna Tolf, C Blake Gilks, Joseph W Carlson
Licensed Content Date	Mar 7, 2014
Licensed Content Pages	10
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Print
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Original Wiley figure/table number(s)	Figure 1.
Will you be translating?	No
Title of your thesis / dissertation	Immunexpression of protein markers of cell differentiation and proliferation in women with low- and high-grade serous ovarian carcinoma
Expected completion date	Jul 2017
Expected size (number of pages)	50
	Campinas, Sao Paulo 1308772 Brazil Attn: Luis Felipe Sallum
Publisher Tax ID	EU826007151
Customer VAT ID	BR27146581802
Billing Type	Invoice